

PATENT NO. 7,598,228
U.S. APPLICATION NO. 10/642,272
ATTORNEY DOCKET NO: 58777.000012

Exhibit A

International Patent Application No. PCT/JP02/01358

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2002年8月22日 (22.08.2002)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 02/064169 A1

- (51) 国際特許分類: A61K 48/00, 31/711, 38/17, A61P 9/02, 9/10, 29/00, 19/02, 25/00, 1/16, 13/12, G01N 33/15, 33/50 // C12N 15/12
- (21) 国際出版番号: PCT/JP02/01358
- (22) 国際出願日: 2002年2月18日 (18.02.2002)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2001-41003 2001年2月16日 (16.02.2001) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): サントリー株式会社 (SUNTORY LIMITED) [JP/JP]; 〒530-8203 大阪府 大阪市 北区 堂島浜 2丁目1番 40号 Osaka (JP). 株式会社サントリー生物医学研究所 (SUNTORY BIOMEDICAL RESEARCH LIMITED) [JP/JP]; 〒618-8503 大阪府 三島郡 島本町 若山台 1丁目1番1号 Osaka (JP).
- (72) 発明者: および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてののみ): 服部 文幸 (HATTORI, Fumiyuki) [JP/JP]; 〒569-0822 大阪府 高槻市
- 津之江町 2-1 0-7-4 02 Osaka (JP). 杉村 恵二郎 (SUGIMURA, Keijiro) [JP/JP]; 〒567-0031 大阪府 茨木市 春日 3-1-2 4-3 01 Osaka (JP). 古谷 真優美 (FURUYA, Mayumi) [JP/JP]; 〒618-0001 大阪府 三島郡 島本町 山崎 4-2-3 Osaka (JP).
- (74) 代理人: 社本 一夫, 外 (SHAMOTO, Ichio et al.); 〒100-0004 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手ビル 206号 ユアサハラ法律特許事務所 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (国内): AU, BR, CA, CN, IL, JP, KR, US.
- (84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。
- (54) Title: METHODS OF TREATING DISEASES IN ASSOCIATION WITH DECREASE IN THE EXPRESSION OF AOP-1 GENE OR AOP-1 AND REMEDIES FOR THE DISEASES
- (54) 発明の名称: AOP-1遺伝子又はAOP-1の発現減少を伴う疾患の治療方法及び当該疾患治療薬
- (57) Abstract: Methods of preventing or treating diseases in association with a decrease in the expression of AOP-1 gene or AOP-1 which comprise: (1) transferring a nucleic acid encoding AOP-1 or a nucleic acid encoding a polypeptide having an amino acid sequence derived from the amino acid sequence of AOP-1 by addition, deletion or substitution of one or more amino acids and having the function of AOP-1, or (2) administering a substance enhancing the expression of AOP-1 gene, a substance enhancing the production of AOP-1 or a substance enhancing the function of AOP-1.
- (57) 要約:

AOP-1遺伝子又はAOP-1の発現減少を伴う疾患の予防又は治療方法において、少なくとも(1) AOP-1をコードする核酸、若しくはAOP-1のアミノ酸配列中のアミノ酸が1つ以上付加、欠失、置換された AOP-1 の機能を有するポリペプチドをコードする核酸を導入すること、又は(2) AOP-1 遺伝子の発現を増強する物質、AOP-1 の産生を増強する物質若しくはAOP-1 の機能を増強する物質を投与することからなる当該予防又は治療方法。

明細書

AOP-1 遺伝子又は AOP-1 の発現減少を伴う疾患の治療方法
及び当該疾患治療薬

5 技術分野

本発明は、疾患の予防方法、治療方法又は診断方法、疾患の予防薬又は治療薬、製剤の有効成分に係る物質のスクリーニング方法、非ヒト形質転換動物、及び形質転換組織等に関する。

10 背景技術

多くの疾患においては、病態の進展に伴い、組織細胞に代償的变化が発生し、一時的なバランス状態となる。さらなる病態悪化の過程で代償機構が破綻し細胞機能低下さらには細胞死が起こる。この細胞脱落により、疾患の治療はより困難となり、予後の不良、再発を招くこととなる。特に心臓をはじめ、脳、腎臓等、

- 15 自己再生不能臓器における疾患治療では細胞の壊死脱落を抑制することが重要な治療方針である。

(1) 心疾患

ア、心不全： 心不全は、心筋収縮力の低下により心臓が各臓器へ十分量の血液を拍出できない状態と定義される。心不全に至る前段階として、心臓は全身の

- 20 血行を正常に保つ目的で代償的リモデリングを行う。この時期には、心筋細胞が持続的に肥大伸展化し、心拍出圧を高く保つと同時に心拍出量を維持するが、同時に心組織内の線維化が進行し、収縮細胞に対する負荷が増加する。心筋細胞に対する負荷と、肥大化による代償とのバランスが限界を迎えた時、心機能が破綻し心不全となる。心不全状態の心筋細胞では、収縮力が低下することが知られている (Am J Physiol 1997 Vol.273(1 Pt 2), H183-91)。
- 25 これまでの慢性心不全治療では心不全状態つまり患者が正常な日常生活に支障をきたした時点から、心筋収縮力を増加させるジギタリス製剤やキサンチン製剤等の強心剤が使用された。しかし、これらの薬剤は心筋エネルギーの過剰消費により、長期投与においては細胞死を促進させ、生存率を悪化させることが明らかにされた。最近では、代償リ

- モデリング期で亢進している交感神経系やレニンアンジオテンシン系による心臓への過剰な負荷を軽減させる β 遮断剤やACE阻害剤による治療が主流になってきている。しかし、心筋細胞の肥大化の防止を作用メカニズムに持つこれらの薬剤は、すでに心不全状態に陥った患者の治療には有効とは言えず、慢性心不全の
- 5 予防的側面が強い。また、これら薬剤の発売後も依然として慢性心不全患者の長期生存率が改善されない事実は、これら薬剤の作用メカニズムの限界を示唆している。よって、代償期破綻後、慢性心不全期における Quality of life、生存率両面の改善をもたらす、新たな慢性心不全治療薬の開発が急務である。代償期から不全期への移行に伴い起こる破綻機構の本質的原因である、細胞死、細胞機能低下を治療する新たな治療薬の開発が望まれる。
- 10

- イ、虚血性心疾患： 虚血性心疾患は、狭心症や心筋梗塞症を含む冠血管性血流不良を特徴とする疾患群である。例えば、狭心症は安静狭心症と労作性狭心症に分類される。現在重症患者では外科的治療が施され、物理的血管拡張後のステント留置等が行われる。比較的軽症の患者に対しては、発作時の治療剤として、
- 15 硝酸薬、ニトログリセリン、ニコランジル等の血管拡張剤が用いられる。また、コレステロール低下剤や、抗血液凝固剤等が、梗塞予防の目的で処方される。このように急性期治療や、血行改善を目的とした治療方法は確立されつつある。そもそも発作は、無症状期の慢性的虚血による傷害蓄積が、心筋適応能を減少させることに起因すると考えられる。しかし、現在この点に対する治療方法は未確立
- 20 である。また、狭心症から、重症心筋梗塞へ移行する患者も多く、狭心症の発症から大規模虚血に対する予防治療を行うことが望ましいが、これに関する適した治療方法も見出されていない。

(2) 神経変性疾患

- 神経変性疾患は、神経細胞の変性を特徴とする一群の疾患であり、具体的には
- 25 脳梗塞、アルツハイマー病、パーキンソン氏病、頭部外傷、ハンチントン舞蹈病、脳血管性痴呆、運動神経変性症、ピンスワンガー病等の白質傷害等が挙げられる。脳梗塞、脳血管性痴呆、頭部外傷、アルツハイマー病、運動神経変性症、パーキンソン氏病等で共通して、神経伝達物質であるグルタミン酸が、細胞外で過剰に濃度上昇することが判明している。(Eur J Neurosci 2000 Vol.12(8), 2735-

- 45)(Brain Res 1994 Vol.11, No.642(1-2), 117-122)(Acta Neurochir Suppl. 2000 Vol.76, 437-8 ; Neurosci Lett 2001 Vol.299(1-2), 37-40 ; J Neurosci Res 2001 Vol.63(5), 377-87 ; Drugs Aging 2001 Vol.18(10), 717-24)。この過剰なグルタミン酸は神経細胞表面の Glutamate receptor (NMDA 受容体) を刺激し、神経の過剰興奮を誘導する。この過剰な神経興奮により細胞内イオン環境の破綻が誘導され、細胞死が起こるとする説が有力である。現在脳梗塞治療剤としては、抗血小板薬、血栓溶解剤が用いられているが、血流の再開、維持を目的としたものであり、神経細胞自体に対する保護作用を有する治療方法は未だ確立されていない。試験段階の治療薬として、NMDA 受容体拮抗薬、グルタミン酸放出抑制剤、活性酸素消去剤が開発中であるが、有効性は未確認である。アルツハイマー病の治療に関しては、最近コリンエステラーゼ阻害剤が唯一治療剤として認められたが、細胞間情報伝達を増強することによる学習機能改善がメカニズムであり、神経細胞死を直接抑制するものではない。一連の神経変性疾患に対する有効な治療方法として、神経細胞保護を作用機序とする治療薬の開発が望まれている。

15 (3) リウマチ

- リウマチのうち特に慢性関節リウマチは、関節滑膜の連続的増殖を特徴とする慢性的関節炎であり、その原因は自己免疫作用に基づくと言われる。老化、遺伝的素因に加え、生活環境の因子が複合的に危険因子を形成し、感染症を初めとする何らかの関節炎症を発端として、自己抗原に対する免疫感作が生じると考えられている。進行した慢性関節リウマチでは、軟骨破壊、骨破壊と同時に、軟骨芽細胞死、骨芽細胞死が報告されている (Arthritis Rheum 1999 Vol.42(7), 1528-37 ; Z Rheumatol 2000 Vol.59, Suppl.1, 10-20)。軟骨芽細胞、骨芽細胞の死によって疾患は不可逆的な段階に入るものと考えられる。現在は、ステロイド、非ステロイド製剤による、免疫抑制作用を基とする治療が行われるが、その治療効果は持続的でなく、根治的でない。そこで、関節、骨芽細胞、軟骨芽細胞保護をメカニズムとする新しい治療剤の開発が望まれている。

25 (4) 腎疾患

腎疾患のうち特に慢性腎不全は、腎臓内の糸球体、尿管の傷害を特徴とする疾患であり、具体的には、糖尿病性腎症、高血圧性腎症、ループス腎症等が挙げ

- られる。血液中の老廃物をろ過する機能を有する糸球体と、尿からの再吸収をその機能とする尿細管における機能異常が発生する原因として、高血糖による糖化蛋白による細胞傷害、高血圧による血行不良による細胞傷害、自己免疫性の慢性腎炎が挙げられる。現在慢性腎不全に対する有効な治療方法は見出されておらず、
- 5 ループス腎炎を初めとする炎症を主体とする場合にはステロイド系、非ステロイド系抗炎症剤が、高血圧性腎不全の場合は降圧剤が対処療法として適用される。現在、糸球体構成細胞、尿細管構成細胞に直接作用し保護する薬剤が望まれている。

(5) 肝疾患

- 10 肝疾患は、ウイルス性、アルコール過剰摂取、薬剤性などの肝炎を経て、肝硬変、肝不全へと至る。治療法には、対症療法として、ウルソデスオキシコール酸、グリチルリチン製剤、漢方療法等がある。ウイルス性肝炎の場合、原因療法としてインターフェロン療法があるが、副作用も強く、治療効果も不完全である。肝臓は再生可能臓器であるが、そもそも肝不全は、肝硬変を初め肝機能が再生不能
- 15 な状態に陥ることであるから、再生能力を超えるストレスが慢性的に加わることが原因の疾患であると言える。よって、肝細胞を保護することが、肝不全予防効果があることは明らかである。しかし現在、副作用の少ない有効な治療方法は見出されていない。

- 一方、AOP-1 遺伝子は、マウス赤白血病細胞を DMSO により分化誘導させた
- 20 場合に発現量が増加する因子として同定された (Gene 1989 Vol.80, 337-343 : 当初の呼称は MER-5 であったが、後に AOP-1 と改名された)。その後 AOP-1 タンパク質は peroxiredoxin ファミリーに属することが判明し、Peroxiredoxin 3 (PRx3) と文献記述されることが一般化した (以下、本明細書では AOP-1 タンパク質を AOP-1 と記載する)。Peroxiredoxin family は、精製蛋白質を用いた生化学的解析より、thiol 基特異的な抗酸化活性を有する (Proc. Natl. Acad. Sci. USA
- 25 1994 Vol.91, 7017-7021) ことを特徴とする一群の蛋白質であり、原核生物からヒトを含む高等生物に広く保存されている。また、最近 bacteria peroxiredoxin を用いた解析から、peroxiredoxin には過酸化亜硝酸 (peroxynitrite) を除去する能力があることが見出された (Nature 2000 vol.407, No.14, 211)。Peroxiredoxin

- family の中でも AOP-1 はミトコンドリアに局在することで、他の peroxiredoxin とは異なる (Methods in enzymology, vol. 300)。抗酸化蛋白として広く知られる superoxide dismutase (SOD) や catalase が、抗酸化活性発現に thiol 基を要求しないことや、過酸化亜硝酸を除去できないこと等から、peroxiredoxin family は
- 5 SOD, catalase とは生理機能面でも異なることが予見される。最近細胞質に存在する peroxiredoxin 1 型及び、2 型の生理機能として、培養甲状腺細胞における過酸化水素傷害に対する保護作用が見出されたが(J. Biological Chemistry 2000 Vol.275, No.24, 18266-18270)、ミトコンドリアに局在する AOP-1 (peroxiredoxin 3 型) の生理機能は見出されていない。また、AOP-1 を含む peroxiredoxin family
- 10 は、未だにいかなる疾患との直接的関連性も示されていない。
- 本発明は、AOP-1 遺伝子又は AOP-1 の発現減少を伴う疾患、例えば、心疾患（慢性心不全、虚血性心不全、虚血性心疾患等）、神経変性疾患（脳梗塞、アルツハイマー病、パーキンソン病、頭部外傷、ハンチントン舞蹈病、脳血管性痴呆、運動神経変性症、ピンスワンガー病等）、リウマチ（慢性関節リウマチ等）、腎
- 15 疾患（腎不全等）、肝疾患（肝炎、肝硬変、肝不全等）の予防方法、治療方法又は診断方法、当該疾患の予防薬又は治療薬、当該製剤の有効成分に係る物質のスクリーニング方法、AOP-1 遺伝子を発現抑制又は欠失する非ヒト形質転換動物、及び形質転換組織等を提供しようとするものである。

20 発明の開示

本発明は以下の事項に係るものである。

- (1) AOP-1 遺伝子又は AOP-1 の発現減少を伴う疾患の予防又は治療方法において、①AOP-1 をコードする核酸、若しくは AOP-1 のアミノ酸配列中のアミノ酸が 1 つ以上付加、欠失、置換された AOP-1 の機能を有するポリペプチドを
- 25 コードする核酸を導入すること、②AOP-1 遺伝子の発現を増強する物質、AOP-1 の産生を増強する物質若しくは AOP-1 の機能を増強する物質を投与すること、又は③AOP-1 タンパク質若しくは AOP-1 のアミノ酸配列中のアミノ酸が 1 つ以上付加、欠失、置換された AOP-1 の機能を有するポリペプチドを投与すること、からなる当該予防又は治療方法。なお、AOP-1 遺伝子とは、通常、AOP-1 をコ

ードする核酸配列（エクソン配列）とその間にある核酸配列（イントロン配列）、さらに AOP-1 遺伝子の転写を制御する核酸配列を含むことを意味するが、本発明において、特に明示されている場合を除き、AOP-1 遺伝子とは AOP-1 mRNA を意味する。

- 5 (2) AOP-1 遺伝子に係る核酸又は AOP-1 のアミノ酸配列中のアミノ酸が 1 つ以上付加、欠失、置換された AOP-1 の機能を有するポリペプチドをコードする核酸を患部組織に導入することからなる上記 (1) 記載の予防又は治療方法。

 (3) AOP-1 遺伝子の発現を増強する物質を投与することからなる上記 (1) 記載の予防又は治療方法。

- 10 (4) AOP-1 の産生を増強する物質を投与することからなる上記 (1) 記載の予防又は治療方法。

- (5) AOP-1 の産生を増強する作用を有する物質が、AOP-1 遺伝子に係る核酸又は AOP-1 のアミノ酸配列中のアミノ酸が 1 つ以上付加、欠失、置換された AOP-1 の機能を有するポリペプチドをコードする核酸である上記 (4) 記載の予防又は治療方法。

- 15 (6) AOP-1 の機能を増強する物質を投与することからなる上記 (1) 記載の予防又は治療方法。

- (7) AOP-1 遺伝子又は AOP-1 の発現減少を伴う疾患が、慢性心不全、虚血性心不全、虚血性心疾患、慢性関節リウマチ、神経変性疾患、肝疾患又は腎不全である上記 (1) 乃至 (6) 記載の予防又は治療方法。

- 20 (8) ①AOP-1 をコードする核酸若しくは AOP-1 のアミノ酸配列中のアミノ酸が 1 つ以上付加、欠失、置換された AOP-1 の機能を有するポリペプチドをコードする核酸、②AOP-1 遺伝子の発現を増強する物質、AOP-1 の産生を増強する物質若しくは AOP-1 の機能を増強する物質、又は③AOP-1 タンパク質若しくは AOP-1 のアミノ酸配列中のアミノ酸が 1 つ以上付加、欠失、置換された AOP-1 の機能を有するポリペプチド、を有効成分として含有する AOP-1 遺伝子又は AOP-1 の発現減少を伴う疾患の予防薬又は治療薬。

 (9) AOP-1 遺伝子に係る核酸又は AOP-1 のアミノ酸配列中のアミノ酸が 1 つ以上付加、欠失、置換された AOP-1 の機能を有するポリペプチドをコードす

る核酸を有効成分として含有する上記（８）記載の予防薬又は治療薬。

（１０）AOP-1 遺伝子の発現を増強する物質を有効成分として含有する上記（８）記載の予防薬又は治療薬。

（１１）AOP-1 の産生を増強する物質を有効成分として含有する上記（８）記載の予防薬又は治療薬。

（１２）AOP-1 の産生を増強する作用を有する物質が、AOP-1 をコードする核酸又は AOP-1 のアミノ酸配列中のアミノ酸が１つ以上付加、欠失、置換された AOP-1 の機能を有するポリペプチドをコードする核酸である上記（１１）記載の予防薬又は治療薬。

（１３）AOP-1 の機能を増強する物質を有効成分として含有する上記（８）記載の予防薬又は治療薬。

（１４）AOP-1 遺伝子又は AOP-1 の発現減少を伴う疾患が、慢性心不全、虚血性心不全、虚血性心疾患、慢性関節リウマチ、神経変性疾患、肝疾患又は腎不全である上記（８）乃至（１３）記載の予防薬又は治療薬。

（１５）AOP-1 遺伝子の発現量又は AOP-1 の産生量を測定し、当該発現量又は産生量を指標として診断することからなる AOP-1 遺伝子又は AOP-1 の発現減少を伴う疾患の診断方法。

（１６）AOP-1 遺伝子又は AOP-1 の発現減少を伴う疾患が、慢性心不全、虚血性心不全、虚血性心疾患、慢性関節リウマチ、神経変性疾患、肝疾患又は腎不全である上記（１５）記載の診断方法。

（１７）AOP-1 遺伝子の発現量又は AOP-1 の産生量を指標として測定する手段を含む AOP-1 遺伝子又は AOP-1 の発現減少を伴う疾患の診断剤又は診断キット。

（１８）AOP-1 遺伝子又は AOP-1 の発現減少を伴う疾患が、慢性心不全、虚血性心不全、虚血性心疾患、慢性関節リウマチ、神経変性疾患、肝疾患又は腎不全である上記（１７）記載の診断剤又は診断キット。

（１９）AOP-1 の産生を抑制、AOP-1 遺伝子の発現を抑制又は AOP-1 遺伝子を欠失することにより AOP-1 遺伝子又は AOP-1 の発現減少を伴う疾患の疾患モデルとして使用できる非ヒト形質転換動物。

(20) AOP-1 遺伝子又は AOP-1 の発現減少を伴う疾患が、慢性心不全、虚血性心不全、虚血性心疾患、慢性関節リウマチ、神経変性疾患、肝疾患又は腎不全である上記 (19) 記載の非ヒト形質転換動物。

(21) AOP-1 の産生を抑制、AOP-1 遺伝子を発現抑制又は AOP-1 遺伝子を
5 欠失することにより AOP-1 遺伝子又は AOP-1 の発現減少を伴う疾患の組織モデル又は細胞モデルとして使用できる形質転換組織又は形質転換細胞。

(22) AOP-1 遺伝子又は AOP-1 の発現減少を伴う疾患が、慢性心不全、虚血性心不全、虚血性心疾患、慢性関節リウマチ、神経変性疾患、肝疾患又は腎不全である上記 (20) 記載の形質転換組織又は形質転換細胞。

10 (23) 上記 (18) 乃至 (21) 記載の非ヒト形質転換動物、形質転換組織又は形質転換細胞に、合成若しくは遺伝子組換え技術により得られた物質、天然由来の物質又はそれらの誘導体である物質を投与又は添加し、AOP-1 遺伝子の発現量または AOP-1 の産生量を検出することを含む、AOP-1 遺伝子の発現を増強する物質、AOP-1 の産生を増強する物質及び AOP-1 の機能を増強する物質から
15 なる群から選ばれる少なくとも 1 つをスクリーニングする方法。

(24) 合成若しくは遺伝子組換え技術により得られた物質、天然由来の物質又はそれらの誘導体である物質を、①AOP-1 遺伝子の転写制御領域及び AOP-1 遺伝子若しくはレポーター遺伝子を有する形質転換細胞又は試験管内発現系と接触させ、AOP-1 遺伝子又はレポーター遺伝子の発現量を検出すること、又は②
20 AOP-1 又は AOP-1 の標的分子と接触させ、AOP-1 又は AOP-1 の標的分子の量を検出すること、を含む AOP-1 遺伝子の発現を増強する物質、AOP-1 の産生を増強する物質及び AOP-1 の機能を増強する物質からなる群から選ばれる少なくとも 1 つをスクリーニングする方法。

(25) AOP-1 遺伝子の転写制御領域をレポーター遺伝子の翻訳領域の上流又は下流に連結した発現ベクターを構築後、適当な宿主細胞に導入して培養し、当該培養細胞に合成若しくは遺伝子組換え技術により得られた物質、天然由来の物質又はそれらの誘導体である物質を添加し、一定時間後にレポーター遺伝子の発現量又はレポータータンパク質の産生量の変化を検出することを含む上記 (24) 記載のスクリーニング方法。

- (26) 合成若しくは遺伝子組換え技術により得られた物質、天然由来の物質又はそれらの誘導体である物質を AOP-1 又は AOP-1 の標的分子と接触させ、当該物質と結合した又は結合しなかった AOP-1 又は AOP-1 の標的分子の量を検出することを含む上記 (25) 記載のスクリーニング方法。
- 5 (27) AOP-1 又は AOP-1 の標的分子を支持体に固定化し、当該固定化した AOP-1 又は AOP-1 の標的分子に、合成若しくは遺伝子組換え技術により得られた物質、天然由来の物質又はそれらの誘導体である物質と AOP-1 又は AOP-1 の標的分子を添加し、結合した又は結合しなかった AOP-1 又は AOP-1 の標的分子の量を検出することを含む上記 (24) 記載のスクリーニング方法。
- 10 (28) 合成若しくは遺伝子組換え技術により得られた物質、天然由来の物質又はそれらの誘導体である物質を支持体に固定化し、当該固定化した物質に AOP-1 又は AOP-1 の標的分子を添加し、結合した又は結合しなかった AOP-1 又は AOP-1 の標的分子の量を検出することを含む上記 (24) 記載のスクリーニング方法。
- 15 (29) 合成若しくは遺伝子組換え技術により得られた物質、天然由来の物質又はそれらの誘導体である物質を、AOP-1 又は AOP-1 の標的分子と接触させ、AOP-1 の抗酸化又は過酸化亜硝酸消去機能を測定することを含む AOP-1 の機能を増強する物質のスクリーニング方法。
- (30) AOP-1 又は AOP-1 の標的分子に、合成若しくは遺伝子組換え技術により得られた物質、天然由来の物質又はそれらの誘導体である物質と AOP-1 又は AOP-1 の標的分子を添加し、AOP-1 の抗酸化又は過酸化亜硝酸消去能を測定することを含む上記 (29) 記載のスクリーニング方法。
- 20 (31) AOP-1 又は AOP-1 の標的分子を支持体に固定化し、当該固定化した AOP-1 又は AOP-1 の標的分子に、合成若しくは遺伝子組換え技術により得られた物質、天然由来の物質又はそれらの誘導体である物質と AOP-1 又は AOP-1 の標的分子を添加し、AOP-1 の抗酸化又は過酸化亜硝酸消去機能を測定することを含む上記 (29) 記載のスクリーニング方法。
- 25 (32) 合成若しくは遺伝子組換え技術により得られた物質、天然由来の物質又はそれらの誘導体である物質を支持体に固定化し、当該固定化した物質に

AOP-1 又は AOP-1 の標的分子を添加し、AOP-1 の抗酸化又は過酸化亜硝酸消去機能を測定することを含む上記（29）記載のスクリーニング方法。

- （33）①AOP-1 遺伝子に係る核酸若しくは AOP-1 のアミノ酸配列中のアミノ酸が 1 つ以上付加、欠失、置換された AOP-1 の機能を有するポリペプチドをコードする核酸、②AOP-1 遺伝子の発現を増強する物質、AOP-1 の産生を増強する物質若しくは AOP-1 の機能を増強する物質、又は③AOP-1 タンパク質若しくは AOP-1 のアミノ酸配列中のアミノ酸が 1 つ以上付加、欠失、置換された AOP-1 の機能を有するポリペプチドの、AOP-1 遺伝子又は AOP-1 の発現減少を伴う疾患の予防薬又は治療薬の製造のための使用。
- （34）AOP-1 遺伝子に係る核酸又は AOP-1 のアミノ酸配列中のアミノ酸が 1 つ以上付加、欠失、置換された AOP-1 の機能を有するポリペプチドをコードする核酸を有効成分として含有する上記（33）記載の使用。
- （35）AOP-1 遺伝子の発現を増強する物質を有効成分として含有する上記（33）記載の使用。
- （36）AOP-1 の産生を増強する作用を有する物質が、AOP-1 をコードする核酸又は AOP-1 のアミノ酸配列中のアミノ酸が 1 つ以上付加、欠失、置換された AOP-1 の機能を有するポリペプチドをコードする核酸である上記（35）記載の使用。
- （37）AOP-1 の産生を増強する物質を有効成分として含有する上記（33）記載の使用。
- （38）AOP-1 の機能を増強する物質を有効成分として含有する上記（33）記載の使用。
- （39）AOP-1 遺伝子又は AOP-1 の発現減少を伴う疾患が、慢性心不全、虚血性心不全、虚血性心疾患、慢性関節リウマチ、神経変性疾患、肝疾患又は腎不全である上記（33）乃至（38）記載の使用。

図面の簡単な説明

図 1 は、各慢性心不全病態モデルラットにおける AOP-1 蛋白質の心肥大期および心不全期での発現変化を示す。

図 2 は、各慢性心不全病態モデルラットにおける AOP-1 遺伝子の心肥大期および心不全期での発現変化を示す。

図 3 は、心筋梗塞後慢性心不全モデルラットにおける AOP-1、TSA、CuZn-SOD、Mn-SOD および Catalase 遺伝子の発現変化を示す。

- 5 図 4 は、AOP-1 遺伝子強制発現が細胞生存率に及ぼす影響を示す。

図 5 は、AOP-1 遺伝子強制発現が細胞自立拍動率に及ぼす影響を示す。

図 6 は、AOP-1 遺伝子強制発現が MTT 分解活性に及ぼす影響を示す。

図 7 は、アンチセンス AOP-1 遺伝子強制発現が培養心筋細胞に及ぼす影響を示す。

- 10 図 8 は、8 a : 腎炎モデルにおける炎症惹起 7 日目における AOP-1 遺伝子の発現量を正常コントロールと比較したものである。8 b : イボテン酸微量注入による神経変性疾患モデルにおける AOP-1、Catalase、CuZn-SOD 遺伝子の発現量を正常コントロールと比較したものである。

- 15 図 9 は、感染性肝炎モデルにおける AOP-1 遺伝子の発現量を正常コントロールと比較したものである。

図 10 は、AOP-1 遺伝子強制発現が培養神経細胞グルタミン酸傷害に及ぼす保護作用を示す。

図 11 は、AOP-1 遺伝子強制発現が培養神経細胞に及ぼす神経突起伸展促進・保護作用を示す。

- 20 図 12 は、図 12 a は、AOP-1、TSA、CuZn-SOD をそれぞれ遺伝子導入した細胞の無酸素条件における培養(Hypoxia)における生存率を示し、図 12 b は、AOP-1、TSA、CuZn-SOD をそれぞれ遺伝子導入した細胞の過酸化水素暴露条件における生存率を示し、図 12 c は、AOP-1、TSA、CuZn-SOD をそれぞれ遺伝子導入した細胞の高グルコース培養条件における生存率を示す。

- 25 図 13 は、図 13 a は、AOP-1 の虚血再灌流における心機能保護作用を示し、図 13 b は、AOP-1 の虚血再灌流における虚血硬直抑制作用を示し、図 13 c は、AOP-1 の虚血再灌流における心筋壊死の抑制作用を示す。

図 14 は、図 14 a は、AOP-1 が神経細胞を保護した結果、PTBBS の量が減少した結果を示し、図 14 b は、AOP-1 が神経細胞を保護したために、対照に比

べ生存する神経細胞が増加したことを示す。図 1 4 b 中の矢印は対照群における障害部位と、AOP-1 遺伝子導入群における同一部位を表す。

- 図 1 5 は、図 1 5 a は、血中尿酸窒素量の経時変化を各群について示し、図 1 5 b は、炎症惹起後 7 日目 AOP-1 が血中尿酸窒素量の上昇を抑制したことを示し、図 1 5 c は、炎症惹起後 28 日目の腎臓組織像であって、AOP-1 が尿細管、糸球体を保護したことを示す。

発明を実施するための最良の形態

- 本発明において、「AOP-1の機能」とは、心臓・心筋細胞代謝活性化作用、心臓・心筋細胞機能保護作用及び心臓・心筋細胞死抑制作用、神経細胞活性化作用、神経細胞死抑制作用、腎機能保護作用に代表される、臓器、細胞の活性化・保護作用をいう。従って、本発明において「AOP-1の機能を有する」とは、臓器、細胞の活性化・保護作用を有することをいう。「AOP-1の機能を有する」かどうかの判定は、(6)スクリーニング方法の項及び実施例で後述する種々の方法を用いて行うことができる。

- 本発明において、心疾患とは、心不全（慢性心不全、虚血性心不全、糖尿病性心不全等を含む）、虚血性心疾患（狭心症、心筋梗塞等を含む）等を意味する。本発明において、神経変性疾患とは、脳梗塞、アルツハイマー病、パーキンソン病、頭部外傷、ハンチントン舞踏病、脳血管性痴呆、運動神経変性症、ビンスワ
- ンガー病等を意味する。本発明において、リウマチには、慢性関節リウマチ等を含む。本発明において、腎疾患とは、糖尿病性腎症、高血圧性腎症、ルーブス腎症等の腎不全等を意味する。本発明において、肝疾患とは、肝炎（ウイルス性肝炎、アルコール性肝炎、薬剤性肝炎を含む）、肝硬変、肝不全等を意味する。

- 発明者らは、心疾患、神経変性疾患、リウマチ、腎疾患、肝疾患の共通現象である細胞機能低下、細胞死を誘導する共通原因を見出すため、一連の実験を行った。

(1) 心疾患

まず、慢性心不全における代償期の破綻の原因を究明するため、心肥大から慢性心不全の進行に伴う、組織における各種のタンパク質の発現変化を測定した。

組織抽出液中の蛋白質混合液を水可溶性画分と界面活性剤可溶性画分の粗画分に分離し、それぞれを2次元電気泳動によって解析した。慢性心不全の病態モデルとして大動脈狭窄ラット（心臓圧負荷モデル）、動静脈シャントラット（心臓容量負荷モデル）、遺伝的高血圧症ラット（SHR）、ダール食塩感受性ラットを用いて比較解析を行った。多くのモデルで共通して代償期の破綻とともに発現量の変化する蛋白質を検索し、普遍的な慢性心不全関連蛋白質群を得た。その中の1つであるAOP-1タンパク質が、代償期の破綻とともに発現減少していることを見出した。

慢性心不全の進行に伴う当該蛋白質の変化が、遺伝子発現レベルにおいて調節を受けたことによるかどうか調査するために、遺伝子発現解析を実施した。その結果、検討したすべてのモデルで当該遺伝子の発現抑制が見られたことから、慢性心不全の進行にともなうAOP-1の減少は、遺伝子発現調節を受けた結果であることが示された。また、虚血性慢性心不全モデルである心筋梗塞後心不全ラットを用いて遺伝子発現解析を行ったところ、当該遺伝子の発現抑制が見られた。よって、多種多様な原因による慢性心不全において普遍的にAOP-1遺伝子の発現低下、さらにはAOP-1が減少することが示された。さらに、2型 Peroxiredoxin である Thiol-specific antioxidant (TSA) の遺伝子発現変化と、抗酸化活性機能において共通性のある CuZn-superoxide dismutase (CuZn-SOD), Mn-superoxide dismutase (Mn-SOD), catalase の遺伝子発現解析を行ったところ、TSA, CuZn-SOD, Mn-SOD, catalase は遺伝子発現量に変化が無いことが判明した。よって、AOP-1 は、peroxiredoxin ファミリー、代表的抗酸化蛋白の中で、特徴的に心不全期への移行に伴い発現減少することが判明した。これは、AOP-1 遺伝子が他の抗酸化蛋白質とは異なる遺伝子調節を受けることを示す。

次に、AOP-1 が、心臓機能の改善もしくは増悪化に対して何らかの作用を持つかどうか検証を行った。まず、ラット AOP-1 遺伝子の全長遺伝子を単離し、適当な発現ベクターを構築した後、AOP-1 遺伝子をラット培養心筋細胞へ導入した。培養細胞を無酸素にて培養した無酸素処理、無酸素培養後再酸素化しさらに一定期間培養を行った再酸素化処理、通常酸素濃度下で培養した無処理、の各実験条件において AOP-1 遺伝子導入群と、強制的な遺伝子発現、蛋白質生産による影

- 響を加味し無害無益な遺伝子である大腸菌 β -galactosidase 遺伝子を導入したコントロール群とで比較解析を行った。比較方法 1 として生存細胞数の確認、比較方法 2 として生存細胞中で自律拍動を示す細胞数の確認、比較方法 3 として MTT 法 (J. Immunol. Methods 1983 Vol.65, 55-63) により生存細胞数と細胞代謝活性の確認を行った。以上 3 点の比較検討を行った結果、コントロール群に対して AOP-1 遺伝子導入群は、生存細胞数が無酸素処理、再酸素化処理で有意に上昇し、同時に自律拍動能を持つ細胞数も有意に増加した。また MTT 法では、コントロール群に対して AOP-1 遺伝子導入群は、無酸素処理、再酸素化処理、無処理において高値を示し、障害時の生存細胞数の増加と、障害、正常時での代謝活性の亢進を示した。つまり、無酸素傷害、再酸素化傷害に対して、AOP-1 は細胞生存率、細胞機能維持の両面で高い有効性を示すことが判明した。さらに我々は、AOP-1 遺伝子の相補鎖を発現するようにデザインした、アンチセンス AOP-1 発現アデノウイルスベクター (アンチセンス AOP-1 ベクター) を構築した。一般に、この種のベクターから発現された mRNA は内在性 AOP-1 遺伝子から発現した mRNA と相補的に結合し、蛋白質への翻訳を阻害すると報告されている (Gene 1990 Vol.91, 261-265)。我々は、アンチセンス AOP-1 ベクター、AOP-1 発現ベクター、 β -galactosidase 発現ベクターを心筋細胞に導入し、未導入細胞と共に 3 日間培養を行った。それぞれに対し、MTT assay を行ったところ、アンチセンス AOP-1 ベクターを導入したもので色素生成が抑制され、巨視的に生存細胞数の減少が観察された。つまり、アンチセンス AOP-1 ベクターによって内在性 AOP-1 の発現が抑制されたことが、細胞の生存に対して悪影響を及ぼしていることが判明した。さらに、AOP-1、TSA、CuZn-SOD の細胞保護作用における有効性を直接比較検証するため、それぞれを強制発現できるアデノウイルスベクターの構築を行った。このベクターにてラット心筋細胞にそれぞれの蛋白質を増強し、以下のストレスに対する耐性を解析した。その結果、過酸化水素、Hypoxia、高グルコースストレスにおいて、AOP-1 が最も有効な細胞保護作用を示した。これにより、細胞維持機構において AOP-1 が、特に重要な役割を担うことが示唆された。また、高グルコース障害における細胞保護作用が見出されたことは、糖尿病性心疾患 (糖尿病に起因する心不全及び虚血性心疾患 (狭心症、心筋梗塞等))

に対する AOP-1 の有効性を示唆する。

以上は、各種心疾患における AOP-1 の減少が、代償機構破綻（病態悪化）の一主要原因をなすことを示す。

- 特に注目すべき点は、AOP-1 が再酸素化における活性酸素傷害のみならず、無
- 5 酸素状態における各種傷害つまり、エネルギー枯渇傷害と細胞内酸性化傷害をも保護できたことであり、さらには通常酸素濃度下における培養で細胞代謝機能を活性化したことである。即ち、AOP-1 の細胞機能保護作用及び細胞死抑制作用は、単に抗酸化作用のみならず、細胞代謝活性化作用（ミトコンドリア活性化作用）を含む新たな機能に基づいてもたらされることが強く示唆された。
- 10 さらに我々は、AOP-1 が生体内で保護作用を発現するかどうか検証する目的で AOP-1 遺伝子を心臓内に導入し、以下の解析を行った。遺伝子を導入後、蛋白質の発現を待ち、心臓をすばやく摘出し灌流装置に接続した。心臓を血液と同等量のガスを含んだ溶液で灌流することで摘出による傷害を抑え、生体内と同等の条件下で心臓機能を保持することに努めた。この心臓を虚血状態にする目的で一時的に灌流を停止し、また再酸素化することによる影響を調べる目的で再灌流を行
- 15 った。AOP-1 を強制発現させた心臓は、陰性対照である遺伝子導入操作のみを行った心臓(Sham)に対して、虚血時の虚血性心硬直が有意に延長され、さらに再灌流時の機能回復が有意に良好であること、さらには有意な再灌流時細胞壊死抑制作用が見られることが判明した。虚血硬直は、心筋細胞 ATP 枯渇と良く関連す
- 20 ることが示されている(J Mol Cell Cardiol 1996, Vol.28, 1045-1057)。AOP-1 が虚血から虚血硬直までの時間を延長したことは、培養心筋細胞にて我々が見出した AOP-1 のミトコンドリア活性化作用が *in vivo* 心においても機能していることを示す。この結果から、AOP-1 は培養細胞のみならず、生体内においても、抗酸化作用に加え、新規のミトコンドリア活性化作用を介して、虚血傷害、再灌流傷
- 25 害を共に保護することが示された。以上から、AOP-1 遺伝子の導入、AOP-1 の発現増強剤、AOP-1 機能増強剤は、虚血性心不全、虚血性心疾患の有効な治療方法であることが示された。虚血性心不全、虚血性心疾患のみならず慢性心不全においても、心肥大に起因する心筋組織内血行不全が報告されていることから (Chin. Med. Sci. J. 1995 Vol.10(3), 151-157)、虚血、虚血再灌流は、慢性心不全

病態に普遍的な傷害要因であると考えられる。故に、当該蛋白質を慢性心不全もしくは慢性心不全兆候を示す病態の心臓に補充することは、心筋細胞死を保護すると同時に、心臓拍出機能を維持させる慢性心不全に対する有効な治療方法と予想される。

5 (2) 心臓以外の疾患形成部位

次に、AOP-1の機能が心臓以外の臓器においても、疾患形成に対して原因であるかどうかを調査する目的で、他の疾患臓器における遺伝子発現解析を行った。結果、腎炎モデルにおける腎臓、神経変性疾患モデルにおける脳、および感染性肝炎(Septic shock)における肝臓においてもAOP-1の発現が低下することが判明した。よって、AOP-1の発現低下が、多くの疾患における普遍的病態形成・悪化に対する一因であることが強く示唆された。また、心不全モデルだけでなく、神経変性疾患モデルの脳組織においてもCuZn-SOD, catalase 遺伝子に発現変化が見られなかったのに対しAOP-1 遺伝子は発現低下を示した。よって、心臓以外の臓器疾患においてもAOP-1 遺伝子の発現は、他の抗酸化蛋白質とは異なる調節を受けることが示された。

10

15

ア、神経変性疾患

脳梗塞、脳血管性痴呆、頭部外傷、アルツハイマー病、運動神経変性症、パーキンソン氏病等では、細胞外グルタミン酸濃度の上昇により Glutamate receptor (NMDA レセプター) の過剰な活性化が生じる (Eur J Neurosci 2000 Vol.12(8), 2735-45; Brain Res 1994 Vol.11, No.642(1-2), 117-122; Acta Neurochir Suppl. 2000 Vol.76, 437-8; Neurosci Lett 2001 Vol.299(1-2), 37-40; J Neurosci Res 2001 Vol.63(5), 377-87; Drugs Aging 2001 Vol.18(10), 717-24)。NMDA レセプターの活性化を受けた細胞は、そのカルシウムチャネルを開口させ、細胞内へのカルシウム流入を起こす。過剰なNMDA レセプターの活性化は、細胞にカルシウム過負荷状態をもたらす。このカルシウム過負荷によって神経細胞がアポトーシスもしくは、ネクロシスを起こし、神経機能障害が不可逆的なものとなる。先に示したようにAOP-1は脳神経変性疾患において発現が低下するため、心疾患と同様にAOP-1を補充することが有効である可能性がある。実際にAOP-1が培養ニューロンにおけるグルタミン酸傷害を保護しうるか検証したところ、

20

25

AOP-1 遺伝子導入細胞は、有意に細胞死が抑制された。さらに、無負荷状態においては、神経突起の伸展を促進しニューロンの機能であるネットワーク形成を活性化することが判明した。よって、AOP-1 は神経細胞において、カルシウム過負荷に対する細胞保護作用、ならびに神経細胞活性化作用という高い有用性を示すことが判明した。

- 5 神経変性疾患動物モデルにおける有効性を確認するために、イボテン酸における脳障害モデルに対する解析を行った。イボテン酸は、NMDA 受容体の作動薬であり、細胞内カルシウム過剰流入を惹起し、神経細胞死を誘発する。脳の海馬に AOP-1 発現遺伝子を導入し、AOP-1 の発現を誘導した後、同部位にイボテン酸を注入した。2 日後脳を摘出し神経細胞を観察した。AOP-1 遺伝子を導入していないものを対照群として比較解析すると、明らかに AOP-1 遺伝子を導入した脳では、神経細胞死が抑制されていた。また、グリア細胞の増殖・浸潤を定量的に解析したところ、対照群に比べて優位な抑制が見られた。グリア細胞の増殖・浸潤は神経細胞死の量に相関することが示されているため (Journal of
- 10 Neuroimmunology 2000 Vol.1009, 105-111 ; Brain Research 1991, Vol.565, 312-320)、この結果は AOP-1 遺伝子の導入により、神経細胞が保護されたことを示している。よって、AOP-1 は組織内の神経細胞に対しても保護作用を有することが判明した。よって AOP-1 を補充することは、脳梗塞、脳血管性痴呆、頭部外傷、アルツハイマー病、運動神経変性症、パーキンソン氏病等の神経変性疾患
- 15 20 患に対し有効であると考えられる。

イ. 腎疾患

先に示したように AOP-1 は腎不全モデルにおいて発現が低下するため、心疾患、神経変性疾患と同様に、AOP-1 を補充することが有効である可能性がある。実際に慢性腎不全に対する AOP-1 遺伝子の有効性を確認するため、Thy-1 腎炎モデルに対する解析を行った。Thy-1 腎炎モデルとは、腎糸球体細胞であるメサンギウム細胞に特異的に発現する Thy-1 cell surface antigen (Thy-1) 蛋白に対する抗体を注入することで Thy-1 に対する自己免疫感作を行う物であり、自己免疫作用によって、メサンギウム細胞の細胞死と、続いて尿管の傷害が発生するものである。一般に Thy-1 腎炎モデルは炎症を主体とする腎不全モデルと考えられ

ている。Thy-1 抗体と同時に AOP-1 遺伝子を注入し、経時的に血中尿素窒素を指標として腎機能を測定した。AOP-1 非導入群を対象として比較解析した結果、AOP-1 遺伝子導入群では有意に腎機能低下が抑制された。よって、AOP-1 は慢性腎不全に対し有効であると考えられる。

5 ウ、肝疾患

- 肝疾患は、ウイルス性、アルコール過剰摂取、薬剤性などの肝炎を経て、肝硬変、肝不全へと至る。肝臓は再生可能臓器であるが、そもそも肝不全は、肝硬変を初め肝機能が再生不能な状態に陥ることであるから、再生能力を超えるストレスが慢性的に加わることが原因の疾患であると言える。よって、肝細胞を保護することが、肝不全予防効果があることは明らかである。先に示したように AOP-1 は肝炎モデルにおいて発現が低下するため、心疾患、神経変性疾患、腎疾患と同様に、AOP-1 を補充することが有効である可能性が示唆された。

エ、リウマチ

- リウマチでは、免疫細胞へと分化し、増殖した滑膜由来細胞、関節へ浸潤した末梢血中の炎症細胞が、軟骨・骨破壊を誘導することによって関節を不可逆的に破壊する。最近、過酸化亜硝酸等のストレスにより、軟骨芽細胞がアポトーシスすることにより軟骨再生ができなくなることが分かってきた (Arthritis & Rheumatism 1999 Vol.42, No.7, 1528-1537 ; J Agric Food Chem. 2001 Vol.49(8), 3614-21)。心疾患、神経変性疾患、腎不全、肝不全の解析結果から、細胞の生死に関わるストレス状態では AOP-1 の発現が低下すると考えられる。よって、リウマチ病態における軟骨芽細胞や骨芽細胞では AOP-1 の発現が低下していると予想される。アポトーシスの細胞内カスケードにはミトコンドリアが深く関与する。また、ミトコンドリアの機能低下がアポトーシスの直接的引き金にもなる (総説:最新医学 1999 年 54 巻 4 号)。我々の解析から、AOP-1 が様々な細胞、組織に対する保護作用を有することを見出している。軟骨芽細胞や骨芽細胞に AOP-1 を補充することは、ミトコンドリア機能を保護、活性化し、軟骨芽細胞死や骨芽細胞死を抑制すると考えられる。これにより、軟骨・骨の再生能力を維持させることが可能となる。

以上により、我々は、新たな AOP-1 機能として、心筋細胞代謝活性化作用、

心筋細胞機能保護作用及び心筋細胞死抑制作用、神経細胞活性化作用、神経細胞死抑制作用に代表される、細胞保護・活性化作用を見出した。さらに我々は、AOP-1の補充が、慢性心不全、虚血性心不全、虚血性心疾患、慢性腎不全、神経変性疾患、リウマチをはじめとする AOP-1 遺伝子又は AOP-1 の発現減少を伴う

- 5 疾患の治療に対して有効であること見出し、本発明を完成した。

なお、本発明においてAOP-1遺伝子又はAOP-1の発現減少を伴う疾患とは、患部組織（例えば、心不全であれば心臓、脳であれば神経細胞、リウマチであれば関節等）において、AOP-1遺伝子又はAOP-1の発現低下を呈する細胞を含有することを意味する。また、AOP-1の量が減ずるとは、細胞内のAOP-1機能が減少した

10 ことと同義である故、遺伝的変異によってAOP-1の機能が低下した疾患も本発明の範疇に含まれる。

本発明に係る AOP-1 遺伝子又は AOP-1 の発現減少を伴う疾患の予防薬又は治療薬の有効成分として使用できる物質には以下の（１）乃至（４）に係る物質を挙げることができる。

- 15 （１）AOP-1 遺伝子の発現を増強する作用を有する物質

AOP-1 遺伝子の発現を増強する作用を有する物質は、合成若しくは遺伝子組換え技術により得られた化合物又は天然由来の化合物並びにそれらの誘導体のいずれでもよいが、そのような物質としては、例えば AOP-1 遺伝子のプロモーターやエンハンサー領域に作用し AOP-1 遺伝子の mRNA への転写を増強する作用を

20 持つ物質、又は細胞中の転写因子等を介して同様の作用を示す物質（例えば、転写因子や co-activator に結合し、DNA や他の転写因子、co-activator への結合を促進する物質、若しくは転写抑制因子や co-repressor に結合し、DNA や他の転写因子、co-repressor への結合を抑制する物質等）が挙げられる。

- （２）AOP-1 の産生を増強する作用を有する物質

- 25 AOP-1 の産生を増強する作用を持つ物質は、合成若しくは遺伝子組換え技術により得られた化合物又は天然由来の化合物並びにそれらの誘導体のいずれでもよいが、そのような物質としては、例えば AOP-1 をコードする核酸（RNA 又は DNA：配列番号 1 乃至 3）又は AOP-1 のアミノ酸配列中のアミノ酸が 1 つ以上付加、欠失、置換された AOP-1 の機能を有するポリペプチドをコードする核酸

- (RNA 又は DNA) が挙げられる。さらに、AOP-1 をコードする核酸 (RNA 又は DNA : 配列番号 1 乃至 3) の相補鎖とストリンジентな条件下でハイブリダイズし、かつ AOP-1 の機能を有するポリペプチドをコードする核酸 (RNA 又は DNA) も含む。例えば、標準的な方法としては、文献 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) に記載されているように、6xSSC, 0.5% SDS, 10mM EDTA, 5xDenhardt's solution, 10mg/ml denatured salmon sperm DNA の溶液中で 68℃ でハイブリダイゼーションを行ってハイブリダイズする核酸を含む。このような核酸は AOP-1 をコードする核酸 (RNA 又は DNA : 配列番号 1 乃至 3) と 90% 以上、好ましくは 95% 以上の配列同一性を有するものが好ましい。また、これらをウイルス変ベクター等他の生物遺伝子中に挿入した物質も同様である。例えば、ウイルスベクター、好ましくはレンチウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、更に好ましくはアデノウイルスベクター、又は化学合成リボソーム、ウイルスエンベロープ、若しくはウイルスエンベロープと合成リボソームの複合体等に、宿主細胞内で機能するようなプロモーター配列、例えばサイトメガロウイルスプロモーター (CMV promoter) 等、の下流に AOP-1 遺伝子を組み込んだ核酸配列を組み込んだものを挙げることができる。

- また、TNF- α の場合、転写後 mRNA の安定性によって TNF- α 産生が調節されており、HuR 蛋白質の結合により安定化されることが知られているが、同様に、AOP-1 mRNA と結合する物質若しくは蛋白質あるいは核酸で、AOP-1 mRNA の分解を阻害する物質若しくは、翻訳の効率を上昇させる活性を有する物質も挙げることができる。

(3) AOP-1 の機能を増強する作用を有する物質

- AOP-1 は、活性部位システイン残基の酸化還元を酵素的に可逆化することによって酸化並びに過酸化亜硝酸活性を消去する。AOP-1 の機能を増強する物質は、合成若しくは遺伝子組換え技術により得られた化合物又は天然由来の化合物並びにそれらの誘導体のいずれでもよいが、そのような物質としては、例えばこの活性化部位システイン残基に結合し、酸化還元サイクルを促進させる物質や、AOP-1 の活性部位以外に結合しアロステリック効果によって活性部位の酸化還

- 元サイクルを促進させる物質を挙げることができる。また、AOP-1とAOP-1が作用するAOP-1標的分子（例えば、受容体）の結合や細胞内でのシグナル伝達を促進し、AOP-1のもつ活性を亢進する物質が挙げられる。例えば、thioredoxinタンパク質はAOP-1に結合し、生化学的な抗酸化活性を上昇させることが分か
- 5 っている。このようなAOP-1機能を増強させる蛋白質それ自体又は遺伝子の導入、化学合成物質等による誘導を介して、間接的にAOP-1の機能を増強することで、有効性を発揮する物質が挙げられる。また、AOP-1を特異的に分解するプロテアーゼの活性阻害物質等も含まれる。

(4) AOP-1タンパク質及びAOP-1の機能を有するポリペプチド

- 10 本発明では、AOP-1遺伝子又はAOP-1の発現減少を伴う疾患の予防薬又は治療薬の有効成分としてAOP-1タンパク質自体又はAOP-1のアミノ酸配列中のアミノ酸が1つ以上付加、欠失、置換されたAOP-1の機能を有するポリペプチドを使用することもできる。

(5) 製剤

- 15 上記のような物質を有効成分として含有する製剤は、通常の製剤化の際に用いられる担体や賦形剤、その他の添加剤を用いて調製される。

- 本発明に係る医薬組成物の有効成分は、遊離型であっても、その医薬的に許容し得る塩であってもよい。無機酸との塩としては、例えば塩酸、硫酸、リン酸との塩が挙げられ、あるいは有機酸との塩としては、例えばギ酸、酢酸、酪酸、コ
- 20 ハク酸、クエン酸等との酸付加塩として用いることができる。塩は、ナトリウム、カリウム、リチウム、カルシウム等の金属塩、有機塩基による塩の形態であってもよい。

- 有効成分は、公知の薬理学的に許容し得る担体、賦形剤、希釈剤等と混合して医薬に一般に使用されている投与方法、例えば、経口投与方法、又は静脈内投与、
- 25 筋肉内投与もしくは皮下投与等の非経口投与方法によって投与するのが好ましい。本発明の医薬組成物は、例えば、有効成分を生理学的に許容される担体、香味剤、賦形剤、安定剤、希釈剤、乳濁剤、溶液剤、懸濁剤、シロップ剤等と、適宜混和することにより製造することができ、錠剤、散剤、顆粒剤、溶液剤等としてもち
- いることができる。錠剤などに混和することができる添加剤としては、例えばゼ

- ラチンのような結合剤、コーンスターチのような潤滑剤等を用いることができ、また糖衣又は易溶性若しくは腸溶性物質のフィルムにより被膜してもよい。カプセルの剤型である場合には、前記の組成物に更に液状担体を含有させることができる。注射のための無菌組成物も、通常の処方を用いて製造することができる。
- 5 注射用の水性液としてはブドウ糖などを含む等張液などがあげられ、ポリエチレングリコールのような適当な溶解補助剤などと併用してもよい。また、緩衝剤、安定剤、保存剤、酸化防止剤、無痛化剤などと配合してもよい。有効成分がペプチドの場合、経口投与では消化管内で分解を受けるため、この投与方法は一般的には効果的ではないが、消化管内で分解を受けにくい製剤、例えば活性成分であるペプチドをリポソーム中に包容したマイクロカプセル剤として経口投与することも可能である。また、直腸、鼻腔内、舌下などの消化管以外の粘膜から吸収せしめる投与方法も可能である。この場合は座剤、点鼻スプレー、舌下錠といった形態で投与することができる。
- 10

- また、遺伝子治療に用いる場合にはウイルスベクター、好ましくはレンチウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、更に好ましくはアデノウイルスベクター、又は化学合成リポソーム、ウイルスエンベロープ、若しくはウイルスエンベロープと合成リポソームの複合体等公知の遺伝子治療に適した媒体に、宿主細胞内で機能するようなプロモーター配列、例えばサイトメガロウイルスプロモーター(CMV promoter)等、の下流にAOP-1遺伝子又はAOP-1遺伝子の発現を増強する物質、AOP-1の産生を増強する物質若しくはAOP-1の機能を増強する物質に係る核酸を組み込んだものを用いることができる。
- 15
- 20

- 本発明の医薬組成物の投与量は、治療に用いられる場合、治療に有効な投与量が決められるが、当該投与量は投与対象者の年齢、体重、症状の程度及び投与経路等によって異なり、個々の場合に依って決められる。通常、経口投与による場合、成人一日当たりの投与量は0.1~1000mg程度であり、これを1ないし数回に分けて投与すればよい。
- 25

(6) スクリーニング方法

本願発明に係る予防薬又は治療薬の有効成分として用いる物質のスクリーニング法としては、例えば以下の方法が挙げられる。

- AOP-1 遺伝子の発現増強又は AOP-1 の産生を増強する物質のスクリーニングに用いる AOP-1 遺伝子若しくは AOP-1 又はそれらの誘導体は、何れの種由来のものであってもよく、例えばヒト (AOP-1 遺伝子: 配列番号 1、AOP-1: 配列番号 4)、ラット (AOP-1 遺伝子: 配列番号 2、AOP-1: 配列番号 5)、マウス (AOP-1 5 遺伝子: 配列番号 3、AOP-1: 配列番号 6) 等哺乳動物由来のものが挙げられる。これらのうち、ヒトに対する予防薬又は治療薬の研究、開発に利用する上ではヒト由来のものを用いることが好ましい。また、動物モデル、即ち、AOP-1 遺伝子を発現抑制又は欠失したことによる慢性心不全症状等を有する非ヒト形質転換動物を用いた研究、開発の必要性からは、例えばマウス、ラット等の動物由来のものを用いることが好ましい。但し、動物モデルを用いて薬剤スクリーニングを行う場合には、ヒト由来のものを用いることが望ましい。

- AOP-1 遺伝子の発現を増強する物質、AOP-1 の産生を増強する物質、又は AOP-1 の機能を増強する物質のスクリーニング方法においては、レポーター遺伝子を利用した方法が一般に利用されている。レポーター遺伝子としては例えば、15 クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT)、 β -ガラクトシダーゼ (β -Gal)、ルシフェラーゼなどが利用できる。AOP-1 遺伝子の発現を増強する物質は、例えば、AOP-1 遺伝子の転写制御領域 (プロモーター、エンハンサー領域等) をレポーター遺伝子の翻訳領域の上流又は下流に連結した発現ベクターを構築し、適当な培養細胞等に導入し、その培養細胞に試料である物質 (当該物質は、20 合成若しくは遺伝子組換え技術により得られた化合物又は天然由来の化合物並びにそれらの誘導体のいずれでもよい) を添加して、一定時間後にレポーター遺伝子の発現量、またはレポータータンパク質の量を測定することによりスクリーニングすることができる。AOP-1 遺伝子の転写制御領域 (プロモーター、エンハンサー領域等) は市販の遺伝子 (genomic) ライブラリーから、AOP-1 cDNA の断片 25 をプローブとしてブラークハイブリダイゼーションを行うことなどにより得ることができる。レポータータンパク質の量は酵素活性として測定することでもよいし、タンパク質の発現量として抗体などを用いて測定することでもよい。

また、AOP-1 の産生を増強する物質には、AOP-1 配列を含む DNA または、RNA が含まれ、これをリボソームや、ウイルス改変ベクターに組み込むことでも

同様の効果を得る事が出来る。

- AOP-1の機能を増強する物質のスクリーニング方法としては、精製AOP-1、または細胞溶解液、望ましくはミトコンドリア画分に對し、過酸化水素、チオール基をもつ還元剤（例えばdithiothreitol）、酵素活性測定が可能なモニター酵素の4種類を混合し、一定時間後のモニター酵素活性を測定することで行うことが挙げられる(Biochemical and Biophysical Research Communications 1994 Vol.199, No.1, 199-206 ; Journal of Biological Chemistry 1996 Vol.271, No.26, 15315-15321)。また、過酸化亜硝酸（peroxynitrite：例えば、酸性化亜硝酸塩と過酸化水素の混合によって得られる）の場合、精製AOP-1、または細胞溶解液、望ましくはミトコンドリア画分に對し、過酸化亜硝酸と酵素活性測定が可能なモニター酵素又は過酸化亜硝酸によって修飾される物質（例えばDNA）の3種類を混合し、一定時間後のモニター酵素活性又は物質の修飾量を測定することで行うことができる(Nature 2000 Vol.407, No.14, 211-215)。即ち、ラジカル傷害によって、モニター酵素が失活することに対するAOP-1の保護活性を測定することによりAOP-1の機能を増強する物質をスクリーニングすることができる。

(7) 診断方法、診断剤及び診断キット

- AOP-1 遺伝子は、その発現量が種々の疾患において疾患の悪化とともに減少することが本発明者らにより明らかにされた。患者のバイオプシーサンプルを用いて、AOP-1 遺伝子の発現量を測定することにより、慢性心不全の増悪の程度を知ることができる。例えば、患者のバイオプシーサンプル 100mg から ISOGEN（ニッポンジーン社）を用いて総 RNA を抽出し、DNase 処理を行った後に、cDNA 合成を行い、適当なプライマーを用いて、PCR 反応により AOP-1 遺伝子を増幅し、ゲル電気泳動によって AOP-1 に相当するバンドの濃さを判定する方法により、AOP-1 遺伝子の発現量を測定することができる。AOP-1 遺伝子発現の定量は、この方法に限らず、例えば実施例 3 に記載の方法やノーザンハイブリダイゼーション法、cDNA アレイ法などをはじめ RNA、DNA の定量法であればどのような方法も利用できる。

また、本発明により AOP-1 遺伝子が種々の疾患の改善因子であることが示されたことにより、AOP-1 遺伝子及びその制御領域に何らかの変異が存在すること

- により AOP-1 の機能が低下したり、遺伝子発現量が減少したりする場合には、その変異を持つ個体は、慢性心不全等の疾患になり易い、あるいは、増悪化しやすい傾向を持つことが容易に考えられる。そこで、これらの遺伝子上の変異を試験することで、リスクファクターの診断が可能となる。遺伝子上の変異を知る方法としては、例えば、患者の血液サンプルから定法に従って DNA を分離し、実施例 1-5 に記載の方法により、その塩基配列を決定し、正常な配列と比較することにより行うことができる。また、一旦変異と慢性心不全の関係が明確になれば、その変異のみを検出する DNA チップ法、SSCP 法などが利用できる。

- また、慢性心不全患者を伴う疾患に罹患した患者のバイオブシーサンプルを用いて、心筋細胞内 AOP-1 の濃度を測定することにより、慢性心不全もしくは、上記疾患の増悪化の程度を知ることができる。測定方法としては、例えば、AOP-1 に対する抗体を利用した ELISA または RIA 法、HPLC やマスマスペクトロメトリーによる定量法などが利用できる。この際、AOP-1 は完全な形である必要はなく、測定可能であれば断片化したものでも良い。

- 更に、本発明は上記の測定手段等を用いた AOP-1 遺伝子の発現量又は AOP-1 の産生量を測定する手段を含む慢性心不全の診断剤又は診断キットを包含する。

(8) AOP-1 遺伝子導入形質転換動物及び形質転換ヒト細胞または組織等

- 本願発明に係る物質の同定は上記 (6) スクリーニング方法に記載したが、AOP-1 の発現を抑制したことによる、慢性心不全症状等を有する非ヒト形質転換動物を利用して行う事も可能である。宿主動物たる非ヒト動物としては、マウス、ラット、ウサギなどの小動物のほか、イヌ、ブタ、ヒツジ、ウシなどの大動物も対象となり、遺伝子を発現し、機能的な生理作用を確認しうる動物であればどのような動物でも良い。遺伝子発現を抑制することは、AOP-1 転写調節領域に変異若しくは欠失等を導入することにより可能であるが、遺伝子発現を抑制するのであれば如何なる方法を用いても良い。また、AOP-1 の産生抑制は、AOP-1 mRNA に対して相補的な DNA 又は RNA を導入もしくは、当該相補配列をコードする遺伝子を導入して得られるが、AOP-1 の産生を抑制できれば如何なる方法を用いても良い。また、遺伝子欠失の方法としては、胎性幹細胞を用いたノックアウトマウス技術が挙げられるが、遺伝子の発現を抑制するシステムであればどのような

なシステムを用いても良い。

本発明を以下の実施例によってさらに詳しく説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

5 実施例

実施例 1：蛋白質 2 次元電気泳動法による AOP-1 の検索

1-1. 慢性心不全病態モデルラットの作製及び左心室サンプルの採取

A. ダール慢性心不全モデルラット

- ダールラットは Spague-Dawley 系ラットにおいて、8%の高食塩含有食を負荷し、継代交配を行うことにより、3代で高血圧易発性の食塩感受性ラット(Dahl-S)と、高血圧を生じない食塩抵抗性ラット(Dahl-R)とに分離されたものである。Dahl-S ラットについては京都大学の木原らの研究により、6 週齢より 8%の高食塩含有食を負荷することにより、代償性左室肥大を呈した後、収縮不全を伴う左室拡大、すなわち非代償性慢性心不全へと移行し、肺鬱血により死亡することが示されている (Am.J.Physiol. 1994 Vol.267, H2471-2482)。本モデルはモデルの作製に特殊な手法を必要とせず、短期間で慢性心不全を発症させることができ、また、一頭体において代償肥大期と非代償慢性心不全期に明瞭に区分でき、ヒトの高血圧性慢性心不全と発症過程が類似している。

- 雄性ダール食塩感受性ラット(Dahl-S)(清水実験材料)を 6 週齢より 8%高食塩含有食で飼育し、心肥大期 (11 週齢) および慢性心不全期 (14 週齢) に左心室を採取した。

B. 腹部大動脈狭窄ラット(圧負荷モデル：圧負荷によるラット心肥大モデル：A O B) の作製及び左心室サンプルの採取

- 実験には Sprague-Dawley 系の 9 週齢雄性ラットを用いた。ペントバルビタールナトリウム (40 mg/kg) の腹腔内投与によりラットを麻酔し、腹臥位に固定して開腹後、腹部大動脈を露出させ、左右の腎動脈間の部分を剥離した。21 G 注射針を大動脈に沿わせ、左右の腎動脈間で大動脈とともに網糸で結紮し、その後注射針を引き抜くことにより、大動脈狭窄を行った。本モデル

ルにおいてはこのような腹部大動脈狭窄により収縮期血圧が上昇し、心臓の後負荷が増大して、左心室の肥大が生じる。偽手術 [Sham-operation (Sham)] 群には腹部大動脈の剥離のみを施した。

- 動脈の狭窄により収縮期血圧は手術後 3 ヶ月目、17 ヶ月目においてそれぞれ
- 5 232mmHg, 188mmHg と通常より高い値を示した。3 ヶ月目で、心重量/体重比の有意な上昇を認め、さらに、17 ヶ月目のラットは 3 ヶ月目に比べ心機能の指標である Fractional Shortening (FS) が 52% から 26% に低下した。よって狭窄手術後 3 ヶ月目を代償性肥大期、17 ヶ月目を非代償慢性心不全期とし、それぞれの左心室ならびに偽手術群の左心室を採取した。

10

C. 腹部動静脈シャントラット(容量負荷モデル: 容量負荷によるラット心肥大モデル: ACS) の作製及び左心室サンプルの採取

- 実験には Sprague-Dawley 系の 9 週齢雄性ラットを用いた。ペン
- 15 トバルビタールナトリウム (40mg/kg) の腹腔内投与によりラットを麻酔し、腹臥位に固定して開腹後、腹部大動静脈を露出させ、太動脈の腎動脈分岐部及び大腿動脈分岐部において、それぞれクランプで血流を停止した。止血した部位で大動脈内に 18G 注射針を挿入し、大静脈へと貫通させ、動静脈シャントを作製した。注射針を引き抜き、動脈部の傷口を手術用接着剤で塞ぎ、クランプをはずした。シャント部で静脈内に動脈血が流入するのを確認した後、閉腹した。
- 20 本モデルにおいてはこのような腹部大動静脈シャントの形成により、静脈圧が上昇し、心臓の前負荷が増大して、右心房、右心室、左心房、左心室の順に負荷が加わり肥大が生じる。さらに、静脈系のコンプライアンスが低いため血液が貯流し、肺うっ血を呈する。偽手術 [Sham-operation (Sham)] 群には腹部大動静脈の剥離のみを施した。

- 25 術後、3 ヶ月、11 ヶ月において、心エコーによる心機能測定を行った後、解剖、心重量ならびに解剖所見を確認した。手術後 3 ヶ月目に比べ 11 ヶ月目のラットではヘマトクリット値が低下すると共に全例で肺水腫が生じており、容量負荷が進行したものと思われた。また右心系の心重量/体重比や肺重量/体重比が増加し、右心室から肺にかけての鬱血が示唆された。FS は 57% から 31% に低下し

た。したがってシャント手術後3ヶ月目を代償期、11ヶ月目を非代償慢性心不全期と判断し、それぞれの左心室ならびに偽手術群の左心室を採取した。

D. 自然発症高血圧ラット(圧負荷モデル)の作製及び左心室サンプルの採取

- 5 自然発症高血圧ラットとして知られている SHR ラットを飼育し、経時的に血圧、心エコー測定を行った。3ヶ月齢の SHR は血圧および心重量/体重比が通常より高く、高血圧による心肥大を呈していた。19ヶ月齢では、立毛、うずくまりなどの外見に加え、FS は56%から32%に低下、収縮期血圧も低下し慢性心不全を呈した。さらに、胸水、浮腫などの症状が見られた。それぞれ解剖
- 10 によって左心室を採取した。

E. 心筋梗塞後心不全モデルラットの作製及び左心室サンプルの採取

- 体重180g-200gのSprague-Dawley(SD)ラットを用いて冠動脈の結紮を行った。結紮後4週後、心機能の測定、心臓摘出後、心肺重量(左右心室、肺)の測定
- 15 を行った。心機能では、拡張末期圧、最大収縮期圧の測定を行った。拡張末期圧は心不全の悪化に伴い上昇するが、今回のモデルでは、sham群に対しVehicle群では3.1倍の上昇が見られた。最大収縮期圧はsham群に対しVehicle群では29%低下した。右心室重量と体重の比は、心肥大に伴い上昇するが、今回のモデルではsham群に対しVehicle群で2.2倍の上昇が見られた。肺重量は心機能の低下に伴
- 20 いうつ血のため上昇するが、今回のモデルでは、sham群に対しVehicle群で2.3倍の上昇が見られた。よって、本モデルは、心筋梗塞後の心肥大による代償期を経て心不全に至る典型的な心不全モデルであると思われる。
- 解剖によって左心室非梗塞領域を採取した。

25 1-2. 蛋白質サンプルの作製

rat heart 1/4 量に対し、1 ml の homogenize buffer 1 (20mM Tris HCl pH7.4, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 1mM PMSF) を添加した。Homogenizer を用いて組織を破壊した後さらに、超音波処理を施した。遠心操作で上清を得、可溶性の蛋白画分とした。沈殿を同 homogenize buffer にて洗浄した後、沈殿と同体積の

homogenize buffer 2 (homogenize buffer 1 + 2% triton X100) を加え再混合して遠心後の上清を膜蛋白質・膜相互作用蛋白画分とした。

1-3. 蛋白質の定量

- 5 蛋白中のペプチド結合が銅の二価イオンをキレートし、Bicinchoninic acid(BCA)と反応して紫色を呈する現象を利用した BCA 法を簡便化した Pierce 社製の蛋白質定量キットを用いて行った。標準蛋白にはキット付属の牛血清アルブミンを用いた。

10 1-4. 二次元電気泳動

A. 一次元電気泳動

125~750 μ g 相当の蛋白質をサンプルバッファー (8M Urea, 0.5% Triton X-100, 10mM DTT, Orange G 微量) に懸濁し、これをもって乾燥ゲル (Pharmacia Biotech.社製 Immobiline Drystrip) を膨潤させた。Pharmacia Biotech.社製

- 15 Multiphor II を用い、製造者の標準操作方法にて泳動を行った。泳動後は-20℃にて1週間を限度に保存し、随時二次元電気泳動に供した。

B. 二次元電気泳動

上記ゲルを平行化バッファー (50mM Tris-HCL, 6M Urea, 30% glycerol, 1%

- 20 SDS) を用いて前処理した後、poly acrylamide gel 上に設置した。これを Biorad 社製の電気泳動装置を用いて泳動した。泳動後直ちに蛋白をゲル中に固定化すると同時に銀染色法を用いて染色し、二次元電気泳動像を得た。

1-5 蛋白発現比較解析

- 25 同一サンプルに対して最低2回の電気泳動を行い、群内の最低2個体に関して発現変化に再現性のある蛋白をそれぞれのモデルでピックアップした。それらのピックアップされた蛋白の中で、多くのモデルで共通して変化する因子を慢性心不全関連蛋白質と位置づけた。その中で後述の実施例 1-6 によって AOP-1 と同定された蛋白質スポットを数値化したグラフを図1に示した。図1において、Dahl、

AOB、ACS、SHRは、それぞれ上述した 1-1. A. からD. で作製した慢性心不全病態モデルラットをいう。

1-6 蛋白質の同定

5 A. 目的蛋白質の polyacrylamide gel からの回収

ゲル片を適当なバッファーで洗い SDS を除いた。ゲル内に trypsin(PROMEGA 社)を浸透させ、ゲル中で目的蛋白質を消化することにより断片化し、ゲル網目から溶出させた。

10 B. 質量分析による AOP-1 の同定

上記 A にて得られた目的蛋白質の断片群を混合物のまま MicroMass 社製質量分析機 (エレクトロスプレー イオン化法/飛行型質量分析機) を用いて解析し、目的蛋白質断片群の質量情報を得た。さらに一部の断片にヘリウムガスを照射しペプチド結合の開裂を行うことによって、蛋白質断片の内部配列 N 末

- 15 [H(I/L)SVNDL]C 末と質量情報(親イオン分子量 1206.6、娘イオン 1069.481, 956.428, 869.418, 770.379, 656.336, 541.324, 428.244)を得た。これらの情報を基に、インターネット上で公開されている遺伝子配列データベースに対して検索を行い AOP-1 を同定した (SwissProt Accession No. P20108 : 配列番号 6)。

20 実施例 2 : AOP-1 遺伝子の発現解析

実施例 1 - 1 - A~D に記載の方法にて得た左心室をサンプルとして用いた。

総 RNA は各左心室より ISOGEN (ニッポンジーン社) を用いて説明書に記載の方法に従って調製し、DNase 処理を行った。DNase 処理した総 RNA それぞれ 1 µg より反応液 50 µl で TaqMan (登録商標) Reverse Transcription Reagents

- 25 (PE Applied Biosystems 社) を用いて cDNA を合成した。遺伝子の発現解析は ABI PRISM 7700 (PE Applied Biosystems 社) を用いたリアルタイム PCR 定量システムにより定量した。AOP-1 検出用のプライマーおよび TaqMan プロブはプライマーデザインソフトウェア ABI PRISM Primer Express を用いて mouse AOP-1 cDNA の塩基配列を基に設計した。フォワード プライマー

5'TGCAGTTTCAGTGGATTCCCA3' (配列番号: 7)、リバース プライマー
5'TTCATGTGGCCCAAACCA3' (配列番号: 8)、TaqMan プローブ
5'TCTTGCCTGGATCAACACACCAAGAAAG3' (配列番号: 9)。

リアルタイム PCR 定量反応は上記 cDNA 1 μ l を鋳型として反応液 40 μ l で

- 5 TaqMan (登録商標) Universal PCR Mater Mix (PE Applied Biosystems 社)
を用いて説明書に記載の方法に従って行った。同様の方法により GAPDH の発現
量を解析し、内部標準として用いた。GAPDH フォワード プライマー
5'TGCACCACCAACTGCCTTAG3' (配列番号: 24)、リバース プライマー
5'GGATGCAGGGATGATGTTTC3' (配列番号: 25)、TaqMan プローブ
10 5'CAGAAGACTGTGGATGGCCCTC3' (配列番号: 26)。GAPDH は、構成的
蛋白質のひとつであり、内部標準として用いることは一般的である。解析結果は
図 2 に示した。その結果すべてのモデルにおいて慢性心不全病態の進行に伴い
AOP-1 遺伝子の発現低下が見られた。

- 15 実施例 3 : TSA(PRx2), CuZn-SOD, Mn-SOD, Catalase 遺伝子の発現解析

実施例 1-1, E に記載の方法にて得た左心室をサンプルとして用いた。

総 RNA は各左心室より ISOGEN (ニッポンジーン社) を用いて説明書に記載
の方法に従って調製し、DNase 処理を行った。DNase 処理した総 RNA それぞれ
1 μ g より反応液 50 μ l で TaqMan (登録商標) Reverse Transcription Reagents

- 20 (PE Applied Biosystems 社) を用いて cDNA を合成した。遺伝子の発現解析は
ABI PRISM 7700 (PE Applied Biosystems 社) を用いたリアルタイム PCR 定
量システムにより定量した。検出用のプライマーおよび TaqMan プローブはプ
ライマーデザインソフトウェア ABI PRISM Primer Express を用いて rat TSA,
CuZn- SOD, Mn-SOD, catalase cDNA の塩基配列を基に設計した。rat TSA フ
25 ォワード プライマー 5'CCCTCTGCTTGCTGATGTGACT3' (配列番号: 10)、
リバース プライマー 5'CCTGTAAGCGATGCCCTCAT3' (配列番号: 11)、
TaqMan プローブ 5'AGCTTGTCCTCCAGAATTACGGCGTGTGAA3' (配列番
号: 12)。CuZn- SOD フォワード プライマー
5'GCGGATGAAGAGAGGCATG3' (配列番号: 13)、リバース プライマー

- 5'GCCACACCGTCCTTTCCA3' (配列番号: 14)、TaqMan プローブ
5'TGGAGACCTGGGCAATGTGGCTG3' (配列番号: 15)。catalase フォワード
プライマー 5'ACGGGTGCTCAGCCTCC3' (配列番号: 16)、リバース
プライマー 5'AGGCTTGTGCCCTGCTTC3' (配列番号: 17)、TaqMan プローブ
5'5' CAGCCTGCACTGAGGAGATCCCTCA3' (配列番号: 18)。
Mn-SOD フォワード プライマー 5'TTACAGATTGCCGCTGCTC3' (配列番号:
21)、リバース プライマー 5'CCAGCAGTGAATAAGGCCT3' (配列番号:
22)、TaqMan プローブ 5'AATCACGACCCACTGCAAGGAACCA3' (配列番号:
23)。
リアルタイム PCR 定量反応は上記 cDNA 1 μ l を鋳型として反応液 40 μ l で
TaqMan (登録商標) Universal PCR Mater Mix (PE Applied Biosystems 社製)
を用いて説明書に記載の方法に従って行った。同様の方法により GAPDH の発現
量を解析し、内部標準として用いた。解析結果は図 3 に示した。その結果 sham
群に対して Vehicle 群で AOP-1 遺伝子の有意な発現低下が見られたのに対し
(p=0.05)、TSA, CuZn-SOD, Mn-SOD, Catalase では遺伝子発現変化は見られ
なかった。

実施例 4: ラット AOP-1 cDNA のクローニング

4-1 rat AOP-1 PCR 断片のクローニング

- 実施例 2 にて作成した cDNA を鋳型として用い、フォワード プライマー
5'AACCGCGGTCGTGGCTCTTGCGTTCTCT3' (配列番号: 19)、リバース
プライマー 5'GCGCTAGCTTATTGATGGACCTTCTCAAAG3' (配列番号: 20)
を用いて PCR を行い、増幅産物を PCR II ベクター (インビトロジェン社)
に TA クローニングした。

25

4-2 塩基配列の決定

塩基配列は、THERMO Sequenase™II dye terminator cycle sequencing kit
(アマシャムファルマシア社製) を用いて自動 DNA 配列読み取り装置モデル
373A (Applied Biosystems 社製) で解析することにより決定した。得られた遺

伝子配列を GenBank のデータバンクに照会した結果、クローンの 1 つ (pFH1) がラット AOP-1 (Genebank Accession No. AF106944 : 配列番号 2) と一致する遺伝子であることが判明した。

5 実施例 5 : AOP-1 発現アデノウイルス改変ベクターの構築

5-1 コスミドの構築

アデノウイルス改変ベクターの構築は、宝酒造株式会社製 Adenovirus Expression Vector Kit を用いて行った。実施例 3 にて構築した pFH1 から AOP-1 遺伝子を含む SacII, NheI 断片を切り出し、pQBI25 (宝酒造株式会社製) にクローニングした。後に NheI, BamHI で GFP 遺伝子を欠失させることにより、CMV promoter の下流に AOP-1 遺伝子、その下流に牛 Growth hormone 由来の poly A シグナルを持った AOP-1 発現ユニットを構築した。この発現ユニットを BglII, DraIII を用いて切り出し、DNA Blunting Kit (宝酒造株式会社製) を用いて末端を平滑化し、Adenovirus Expression Vector Kit 付属のコスミド pAxcw の SmaI site にクローニングした。

5-2. 293 細胞を用いた AOP-1 発現アデノウイルス改変ベクターの作製と増幅

上記のコスミドと Adenovirus Expression Vector Kit 付属の DNA-TPC を 293 細胞 (Bio Whittaker 社製) に co-transfection した。293 細胞内で、AOP-1 cosmid と、DNA-TPC が相同組換えを起こし、AOP-1 発現アデノウイルス改変ベクターが構築され、293 細胞が恒常的に発現する E1 蛋白の働きを借り、ウイルスとして増殖する。なお、作成した AOP-1 発現アデノウイルス改変ベクターは E1 遺伝子を欠失しており、人為的に E1 遺伝子を構成的に発現するよう形質転換された細胞内 (例えば 293 細胞) でしか増殖することが出来ない。

5-3. AOP-1 発現アデノウイルス改変ベクターのタイターチェック

実施例 4-2 にて構築された AOP-1 発現アデノウイルス改変ベクターのタイターチェックは、Adenovirus Expression Vector Kit 付属のマニュアル記載の方法に順じて行った。

実施例 6 : ラット培養心筋細胞の作製と AOP-1 遺伝子導入

- 生後 1 乃至 3 日目の新生児ラットをエーテル麻酔し、decapitation 後心臓を摘出した。心室を単離し、collagenase (warthington biomedical corporation 社製)
- 5 消化によって細胞を分散させた。Percoll (amersham pharmacia biotech 社製)を用いて密度勾配遠心を行い、心筋細胞と、非心筋細胞を分取した。牛胎仔血清 (EQUITECH-BIO 社製) を終濃度 10% で混合した日研生物医学研究所社製 D-MEM (low glucose) 培地を用いて、分取した心筋細胞を培養した。実施例 5 にて作製した AOP-1 発現アデノウイルス改変ベクターを 1.6×10^9 (M.O.I.) で 1 時間
- 10 感染させた後、培地にて 2 回洗浄した。24 時間培養後、実施例 7 に供した。

実施例 7 : 遺伝子導入細胞に対する無酸素培養、再酸素化ストレス応答解析

- 実施例 5 と同様の方法にて作製した β -galactosidase 発現アデノウイルス改変ベクターを用いて、実施例 6 と同様の方法にて作製した β -galactosidase 強制発
- 15 現細胞を作製した。これを遺伝子導入系にて無害無益蛋白質を強制発現させた比較対照群に位置づけ、以下の実験に加えた。実施例 6 にて作製した AOP-1 強制発現細胞とコントロール細胞を、無酸素培養系に 24 時間、その後大気酸素濃度、5 % 炭酸ガス濃度での通常培養系に戻し (再酸素化) 72 時間培養を行った。また、同時に通常酸素濃度で、24 時間培養を行った通常酸素濃度対照群も作製した。通
- 20 常酸素下で培養した細胞、無酸素培養後、再酸素化培養後の細胞をそれぞれサンプリングし、顕微鏡下で観察を行った。生存する細胞数、自律に拍動する細胞数を測定し統計処理した。その後、ミトコンドリア呼吸鎖に属する succinate-tetrazolium reductase 系が、MTT 試薬 (ナカライテスク社製) を還元することを利用した、細胞生存率、細胞代謝活性測定試薬を用いて解析を行った。
- 25 その結果、通常酸素濃度下で培養した AOP-1 導入群、コントロール群間では、細胞生存率に差が無かったのに対して、無酸素条件下 24 時間培養後、再酸素化培養後の細胞生存率は、AOP-1 遺伝子導入群で有意な増加を示した (図 4)。また、無酸素条件下 24 時間培養後、再酸素化培養後の細胞自律拍動率は、AOP-1 遺伝子導入群で有意な増加を示した (図 5)。さらに、MTT を用いた実験にお

いても、無酸素条件下 24 時間培養後、再酸素化培養後において、AOP-1 遺伝子導入群で有意に MTT 分解活性の上昇が観察された（図 6）。特に、通常酸素濃度下における培養つまり無傷害状態で細胞代謝機能を活性化したこと（図 6）より、AOP-1 はミトコンドリア機能を向上させる可能性が示唆された。

- 5 一般に、酸素欠乏状態における細胞内では、好氣的エネルギー産生系から、嫌氣的エネルギー産生系への切り替えが起こり、クエン酸の蓄積等による細胞内酸化性傷害、嫌氣的エネルギー産生系が好氣的エネルギー産生系に対して非効率であるために、細胞内エネルギーの枯渇傷害が発生すると考えられている。また、再酸素化時には、ミトコンドリアにおいて活性酸素種が発生することが示されており、蛋白質、DNA、細胞膜リン脂質等の酸化を経て細胞に傷害を与える。本実施例における結果から、AOP-1 は心筋細胞におけるこれらの傷害を除去し、細胞の正常な機能を維持する活性を有することが明らかとなった。

- 10 虚血性慢性心不全（心筋梗塞後慢性心不全）のみならず慢性心不全においても、心機能の低下、心肥大に起因する、心筋細胞に対する血流不足（虚血）が報告されていることから、当該蛋白質を慢性心不全状態の心筋細胞に補充することにより、心筋細胞を保護し、さらに拍出機能を維持させることにより、慢性心不全治療薬となる。

実施例 8：アンチセンス AOP-1 発現アデノウイルス改変ベクターの構築

- 20 実施例 5 で用いた CMV promoter の下流に AOP-1 遺伝子、その下流に牛 Growth hormone 由来の poly A シグナルを持った AOP-1 発現ユニットから、AOP-1 遺伝子を切り出し、切り出した両方のフラグメントを DNA Blunting Kit（宝酒造株式会社製）を用いて末端を平滑化し、再び ligation した。AOP-1 のクローニングされた方向を配列解読によって確認した。この発現ユニットを BglII, 25 DraIII を用いて切り出し、DNA Blunting Kit（宝酒造株式会社製）を用いて末端を平滑化し、Adenovirus Expression Vector Kit 付属のコスミド pAxcw の SmaI site にクローニングした。これを用い、実施例 5 と同様にウイルスベクター（adenovirus vector アンチセンス AOP-1 cosmid）を作製した。

実施例 9 : 培養心筋細胞に対するアンチセンス AOP-1 遺伝子強制発現の影響

- 実施例 6 と同様の方法にて、アンチセンス AOP-1、AOP-1、 β -galactosidase 強制発現細胞を作製した。未導入細胞と共に、上記遺伝子導入細胞を 7 2 時間培養を行った後、ミトコンドリア呼吸鎖に属する succinate-tetrazolium reductase
- 5 系が、MTT 試薬 (ナカライテスク社製) を還元することを利用した、細胞生存率、細胞代謝活性測定試薬を用いて解析を行った。すると、アンチセンス AOP-1 導入細胞群でのみ有意に、MTT 試薬分解物の生成が抑制されていた (図 7)。
- 顕微鏡下で観察を行った結果、アンチセンス AOP-1 群では、有意に生存細胞数の減少が見られた。よって、アンチセンス AOP-1 の強制発現は、培養心筋細胞
- 10 の生存に不利に作用することが判明した。

実施例 10 : その他病態モデルの作製

A. 腎炎モデルの作製

- 8週齢のWistar系雌性ラットを用いた。エーテル麻酔下で左腎臓を摘出した。
- 15 その1時間後にanti-Thy-1 monoclonal antibody (1-22-3), 500 μ g/rat を静脈内投与することによって腎炎を惹起した(Acta Pathol. Jpn. 36:1191,1986)。腎炎惹起後経時的 (1日、4日、7日、14日、28日後) に腎臓を摘出した。

B. septic shock(感染性肝炎)モデルの作製

- 150-300gの同週齢ラット3匹に対し、lipopolysaccharide 10mg/kgを腹腔内投与し、2時間後肝臓を摘出した。
- 20

C. 脳障害モデルの作製

- slc wistar 雄性ラット (11w) をネンブタール麻酔下に脳定位固定装置に固定し、頭蓋骨露出後、ブregマ、ラムダの水平を確認し、ブregマより後方 4.5 mm、側方 2.7 mm に直径約 0.5 mm 程度の穴を開けた。マイクロシリッジを用いて、ブregマより深さ 3.0 mm の部位にイボテン酸 0.6 μ g を注入した。72
- 25 時間後切片用サンプルを回収し、遺伝子発現解析に供した。イボテン酸はグルタミン酸アナログであり、NMDA レセプターに特異性を持たせた化合物である。よって、イボテン酸による神経細胞傷害は、上述したグルタミン酸傷害の2つの主要なメカニズムの内、NMDA レセプターの過剰興奮を介する神経細胞傷害

を起こすものである。

実施例 11 : その他病態モデルでの AOP-1 並びにその他の遺伝子の発現解析

- 総 RNA は上記実施例 10 で得られた各臓器の組織より ISOGEN (ニッポンジ
5 ーン社) を用いて説明書に記載の方法に従って調製し、DNase 処理を行った。
DNase 処理した総 RNA それぞれ 1 μ g より反応液 50 μ l で TaqMan (登録商標)
Reverse Transcription Reagents (PE Applied Biosystems 社) を用いて cDNA
を合成した。遺伝子の発現解析は ABI PRISM 7700 (PE Applied Biosystems 社)
を用いたリアルタイム PCR 定量システムにより定量した。AOP-1 並びにその他
10 の遺伝子検出用のプライマーおよび TaqMan プローブはプライマーデザインソ
フトウェア ABI PRISM Primer Express を用いて mouse AOP-1 cDNA の塩基配
列を基に設計した。AOP-1 フォワード プライマー (配列番号: 7)、リバース プ
ライマー (配列番号: 8)、TaqMan プローブ (配列番号: 9)。TSA フォワード
プライマー (配列番号: 10)、リバース プライマー (配列番号: 11)、
15 TaqMan プローブ (配列番号: 12)。CuZn-SOD フォワード プライマー (配
列番号: 13)、リバース プライマー (配列番号: 14)、TaqMan プローブ
(配列番号: 15)。catalase フォワード プライマー (配列番号: 16)、リバ
ース プライマー (配列番号: 17)、TaqMan プローブ (配列番号: 18)。
Mn-SOD フォワード プライマー (配列番号: 19)、リバース プライマー (配列
20 番号: 20)、TaqMan プローブ (配列番号: 21)。

- リアルタイム PCR 定量反応は上記 cDNA 1 μ l を鋳型として反応液 40 μ l で
TaqMan (登録商標) Universal PCR Mater Mix (PE Applied Biosystems 社)
を用いて説明書に記載の方法に従って行った。同様の方法により GAPDH の発現
量を解析し、内部標準として用いた。解析結果は (図 8 a : 腎炎モデル、8 b :
25 脳障害モデル及び図 9 : 感染性肝炎モデル) に示した。その結果各疾患モデルの
疾患臓器において病態の進行に伴い AOP-1 遺伝子の発現低下が見られた。

実施例 12 : 胎仔ラット由来培養神経細胞の作製

Wistar 系妊娠 18~20 日目ラットをエーテル麻酔した後、開腹した。子宮より

胎児を取り出し、さらに胎仔から脳を取り出し氷冷 HBSS（組織培養用 ハンクス液「ニッスイ」②（日水製薬社） 9.8 g/l、 NaHCO_3 0.35 g/l を作製した濾過滅菌）中に保存した。直ちに実体顕微鏡下で大脳を分離し、蛋白質分解酵素 papain（worthington 社）にて細胞を分散させた。馬血清を終濃度 10%で混合した日

5 研生物医学研究所社製 D-MEM (high-glucose)培地を用いて、分取した神経細胞を培養した。培養開始後、4 日目上記血清含培地を加え、さらに 3 日間培養を行った。合計 7 日間培養後、AOP-1 もしくは β -galactosidase アデノウイルスベクターによる遺伝子導入を行った。遺伝子導入後 4 8 時間培養し、グルタミン酸傷害、無血清化等の刺激を行った。

10

実施例 13 : AOP-1 の培養神経細胞におけるグルタミン酸傷害保護作用の検出

- 実施例 12 にて作製した培養神経細胞に対し、実施例 6 と同様の方法にて AOP-1 遺伝子の導入を行った。実施例 7 と同様に β -galactosidase を強制発現させた群を比較対照に位置づけ、以下の実験に用いた。終濃度 0, 100, 500 μM 、で
- 15 glutamate を加え 4 8 時間培養した後、MTT assay に供した。glutamate を加えなかった、それぞれの遺伝子導入群の MTT 値で、glutamate 傷害群を割り返したものを神経細胞保護率としてグラフ化した（図 10）。なお、図 10 中の、MK-801 は、(+)-dibenzocyclohepteneimine であり、NMDA レセプターのアンタゴニストであり、神経培養細胞をグルタミン酸傷害から守ることが示されている
- 20 (Eur J Pharmacol 1993 Vol.248(4) 303-312)。図で示したように、AOP-1 導入群は MK-801 非添加群において、 β -galactosidase 導入群に比較して培養神経細胞保護傾向を示した。さらに、MK-801 添加群においては、 β -galactosidase 導入群に比較して有意に培養神経細胞保護作用を示したので、AOP-1 は MK-801 の保護作用に対し相加作用を持つことが示された。神経細胞におけるグルタミン
- 25 酸傷害には、前述の NMDA レセプターを介するカルシウム過負荷と、cystine, glutamate-antiporter の活性化を介する細胞内 cystine 枯渇傷害(Neuroscience 1992 Vol.48(4) 906-914)の二つが見出されている。上記の結果から、AOP-1 は上記二つの傷害に対する保護作用を併せ持つと考えられる。

実施例 14 : AOP-1 の培養神経細胞神経突起伸展促進作用の検出

実施例 12 にてグルタミン酸未添加の細胞 (10% FBS 群)、グルタミン酸添加 (10% FBS 群 + 100 μ M glutamate 群) 無血清化 (0% FBS 群)、を写真撮影した (図 11)。

- 5 各種刺激存在下で常に AOP-1 導入群で神経突起伸展促進、保護作用が観察された。

実施例 15 : AOP-1, TSA, CuZn-SOD の培養心筋細胞に対する保護作用の比較

- 実施例 4 に記載の方法で rat TSA を取得し、配列確認を行った (配列番号 27)。
- 10 配列番号 28 は、配列番号 27 から翻訳される蛋白質配列を表す。また、CuZn-SOD は文献 (FEBS letter 1990 Vol.20:269(1) 89-92) に記載された human CuZn-SOD 遺伝子 (配列番号 29) を含むプラスミド (pYSO200) を著者から入手し用いた。配列番号 30 は、配列番号 29 から翻訳される蛋白質配列を表す。
- 15 各種遺伝子に対し実施例 5 に記載した方法を用いて、TSA 発現アデノウイルス改変ベクター、CuZn-SOD 発現にアデノウイルス改変ベクターを作製した。また、実施例 6 に記載の方法を用いて作製した培養心筋細胞に、同じく実施例 6 に記載の方法を用いて遺伝子導入を行った。ストレス耐性に関する解析は以下のように行った。

① 無酸素条件培養 (Hypoxia) における細胞生存率

- 20 遺伝子導入後 24 時間培養した細胞を無酸素条件に暴露しさらに 24 時間培養を行った。細胞生存率を実施例 7 に記載の MTT 法を用いて測定した。AOP-1, TSA, CuZn-SOD 遺伝子を導入した細胞は、対照 (β -galactosidase 導入細胞) に対しそれぞれ有意 ($p < 0.01$) な生存率増加作用を示した。AOP-1 遺伝子を導入した細胞は TSA を導入した細胞に対し有意に生存率が増加し、CuZn-SOD 導入細胞に対して生存率が増加傾向を示した (図 12a)。
- 25

② 過酸化水素暴露による細胞生存率

遺伝子導入後 24 時間培養した細胞を 0.1, 1mM 過酸化水素に暴露しさらに 24 時間培養を行った。細胞生存率を実施例 7 に記載の MTT 法を用いて測定した。AOP-1 遺伝子を導入した細胞は、有意 ($P < 0.05$) に対照に対し有意に細胞生存率が

増加した。しかし、TSA、CuZn-SOD 導入群では、細胞生存率改善傾向は示したが、統計的に有意($p<0.05$)ではなかった(図 12b)。

③ 高グルコース培養条件による細胞生存率

- 遺伝子導入後 24 時間培養した細胞を 30mM Glucose (通常濃度の 6 倍程度) に暴露しさらに 24 時間培養を行った。細胞生存率を実施例 7 記載の MTT 法を用いて測定した。AOP-1 遺伝子を導入した細胞は、対照に対し有意($P<0.05$)に細胞生存率が増加した。しかし、CuZn-SOD 導入群では、細胞生存率改善傾向は示したが、統計的に有意な差ではなかった。

- また、TSA 遺伝子導入細胞では、対照に対し生存率に差が無かった(図 12c)。
- 10 高グルコース培地培養は糖尿病時高血糖状態に近似すると考えられ、AOP-1 はこれに纏わる合併症にも効果があると考えられる。

実施例 16 : AOP-1 の心臓保護作用

- ラット心臓に AOP-1 発現アデノウイルス改変ベクターの感染を行った。同時に希釈液(生理食塩水)を用いて感染操作のみを行った Sham 群を作製した。感染方法は文献(circulation 2001 Vol.104 1424-1429)に準じた。導入後 4-5 日動物を飼育した後ランゲンドルフ虚血再灌流実験に供した。pentobarbital・Na (50 mg/kg, i.p.)で麻酔し、尾静脈より heparin(500U/kg)を投与した。開胸後、心臓を肺とともに摘出し、大動脈にカニューレを挿入後、Langendorff 法(70 mmHg 定圧灌流)で灌流した。圧トランスデューサーに接続したラテックスバルーンを左心耳から左心室内へ挿入し、左心室圧を測定した。左室拡張末期圧が約 5 mmHg になるようにバルーン内に水を充填させた。灌流液は modified Krebs Henseleit bicarbonate buffer (mM: NaCl 118, KCl 4.7, $CaCl_2$ 1.25, $MgSO_4$ 1.2, KH_2PO_4 1.2, $NaHCO_3$ 25.0, glucose 11.0)を用いた。右心房をペースメーカーにより約 280 bpm でペーシングし心拍数を一定に保った。

灌流液を 35 分間停止させることで虚血を施し、その後、灌流を 30 分間再開させることで虚血再灌流障害を作製した。虚血前および再灌流 30 分後に左心室圧を測定し、心機能回復率を求めた。また、虚血開始から虚血硬直を生ずるまでの時間を調べた。虚血硬直は、心筋細胞 ATP 枯渇と良く関連することが示されて

いる(J Mol Cell Cardiol 1996, Vol.28, 1045-1057)。さらに、心灌流液中に放出される Lactate dehydrogenase(LDH)活性を測定(再灌流後1~30分)することで、心筋細胞壊死量を比較した。

- AOP-1を強制発現させた心臓は、遺伝子導入操作のみを行った Sham 群の心臓
- 5 に対して、再灌流時の機能回復が有意に良好であることが判明した(図13a)。また、虚血から虚血硬直に至る時間を計測したところ、AOP-1を強制発現させた心臓は、対照群(Sham 群)に対し有意に延長効果を示した(図13b)。これは、AOP-1が虚血時心筋細胞内のATP減少を抑制したことを示す。また、虚血再灌流後、心灌流液中に放出されるLDH活性量を測定したところ、AOP-1群では、
- 10 対照群に対し有意にLDH放出を抑制した(図13c)。LDHの放出は、細胞傷害、細胞壊死に相關するマーカー蛋白質として一般的である(Am J Physiol 2001, Vol.280, H2313-2320)。よって、AOP-1は再灌流時の細胞壊死を抑制したと考えられる。上記の結果から、AOP-1は培養細胞のみならず、生体内においても、抗酸化作用に加え、新規のミトコンドリア活性化作用を介して、虚血傷害、再灌
- 15 流傷害を共に保護することが判明した。

実施例17：AOP-1の脳保護作用

- 実施例10-cにより脳障害モデルを作製する手法を用いて、AOP-1発現アデノウイルス改変ベクターを脳海馬内に 8.5×10^6 PFU注入した。その72時間後、
- 20 同一部位にイボテン酸を実施例10-cと同様に注入した。対照群として β -galactosidase 遺伝子導入群を作製し、同様にイボテン酸処理を施した。72時間後組織切片用サンプルを回収し、12日後peripheral benzodiazepine binding site (PTBBS) 解析用のサンプル回収を行った。PTBBS 解析とは、benzodiazepine に対する結合性を指標とした、グリア細胞の増殖・遊走の定
- 25 量的解析方法である。これは、神経細胞死によりグリア細胞が活性化し遊走増殖する、いわゆるグリオシスを測定する方法として一般的である(Journal of Neuroimmunology 2000 Vol.1009 105-111, Brain Research 1991 Vol.565 312-320)。切片用のサンプルを用い、凍結切片法にて厚さ $10 \mu\text{m}$ の切片を作成し、神経細胞特異的染色方法であるニッスル染色に供した。PTBBS 解析用

- のサンプルは、密閉式組織破砕器にて海馬を破壊し、組織溶解液を作製した。蛋白質濃度を実施例 1-3 記載の方法で求めた。トリチウム標識した benzodiazepine を組織溶解液に混合し、37℃で1時間結合反応を行った。この後、蛋白質とそれに結合したトリチウム標識 benzodiazepine をガラス繊維フィルターにトラップし、結合しなかったトリチウム標識 benzodiazepine を洗浄除去した。上記ガラス繊維フィルターの放射能を定量した。PTBBS 解析では、対照群(β -galactosidase 発現群)に対し、AOP-1 遺伝子導入群は、有意にグリア細胞の増殖・遊走を抑制した(図 14a)。また、組織切片を神経細胞を特異的に染色すると、対照群に対して AOP-1 遺伝子導入群では定性的に神経細胞が保護されていることが分かった(図 14b)。上記解析により、AOP-1 は脳神経細胞を保護する効果をもつことが判明した。

実施例 18 : AOP-1 の腎保護作用

- Wister rat 雌 7 週齢を片腎摘し、Thy-1 抗体の注入を行った。Thy-1 抗体注入直後、一部の動物には AOP-1 または、 β -galactosidase を強制発現するアデノウイルスベクターの静脈内注入を行った。さらにアデノウイルスベクターの感染を1週間毎、合計3回行った。Thy-1 感作後、3日、7日、14日、28日に血液サンプルを回収し、血中尿素窒素量(BUN)の解析を行った。28日後組織回収を行い、糖タンパク染色法である PAS 染色による組織像を得た。組織像解析の結果 AOP-1 遺伝子導入群における1個体で Thy-1 腎炎における他の個体所見と比較して人為的な病因を見出し、かつ Day7 の BUN 解析の結果を棄却検定(Thompson)にて解析した場合においても棄却されたので、解析から除外した。

- 図 15a に血中 BUN 量の変化を経時的に表示した。Day7 においては、sham 群(Thy-1 腎炎非惹起、非遺伝子導入群)と Vehicle 群(Thy-1 腎炎惹起、非遺伝子導入群)の間に有意差があったが、他の全ての時期において Vehicle 群、sham 群間に有意差は見られなかった。Day7 の結果に注目した(図 15b)ところ、Vehicle 群に対し、AOP-1 遺伝子導入群の間に有意な保護作用を見出した。また、AOP-1 導入群は Sham 群に対して有意な差を認めなかった。図 15

cに典型的な組織像を示した。Vehicle 導入群では、四角で囲んだ部位において広範囲な尿細管の萎縮像が見られ、正常尿細管がほとんど存在しないのに対し、Sham 群では全く傷害が見られない。AOP-1 導入群でも四角で囲んだ部位において尿細管の萎縮が見られるが、その範囲は Vehicle 群に比べて限局されたもので、正常な尿細管が圧倒的に多いことが注目される。丸で囲んだ部位は糸球体を示す。Sham 群と Vehicle 群を比較すると、色素沈着（濃い紫色の部分：*印）が広範囲に見出される。AOP-1 導入群と Vehicle 群を比較すると、この色素沈着が AOP-1 群では少ない。この色素沈着は腎メサンギウム細胞の増殖を示す。メサンギウム細胞は糸球体傷害に伴い見出されることが示されており（Lab. Invest. 1992 Vol.66 485-497）、また、過剰なメサンギウム細胞の増殖が糸球体硬化による機能障害を誘導することも示されている（Kidney international 1995 Vol.48 111-117）。よって色素沈着の抑制すなわちメサンギウム細胞の増殖抑制は、AOP-1 が腎機能を保護した結果と考えられる。以上の結果から、AOP-1 に腎障害を抑制する能力があることが判明した。

請求の範囲

1. AOP-1遺伝子又はAOP-1の発現減少を伴う疾患の予防又は治療方法において、(1) AOP-1をコードする核酸、若しくはAOP-1のアミノ酸配列中のアミノ酸が1つ以上付加、欠失、置換されたAOP-1の機能を有するポリペプチドをコードする核酸を導入すること、又は(2) AOP-1遺伝子の発現を増強する物質、AOP-1の産生を増強する物質若しくはAOP-1の機能を増強する物質を投与すること、からなる当該予防又は治療方法。
2. AOP-1をコードする核酸又はAOP-1のアミノ酸配列中のアミノ酸が1つ以上付加、欠失、置換されたAOP-1の機能を有するポリペプチドをコードする核酸を患部組織の細胞に導入することからなる請求項1記載の予防又は治療方法。
3. AOP-1遺伝子の発現を増強する物質を投与することからなる請求項1記載の予防又は治療方法。
4. AOP-1の産生を増強する物質を投与することからなる請求項1記載の予防又は治療方法。
5. AOP-1の産生を増強する作用を有する物質が、AOP-1をコードする核酸又はAOP-1のアミノ酸配列中のアミノ酸が1つ以上付加、欠失、置換されたAOP-1の機能を有するポリペプチドをコードする核酸である請求項4記載の予防又は治療方法。
6. AOP-1の機能を増強する物質を投与することからなる請求項1記載の予防又は治療方法。
7. AOP-1遺伝子又はAOP-1の発現減少を伴う疾患が、慢性心不全、虚血性心不全、虚血性心疾患、慢性関節リウマチ、神経変性疾患、肝疾患又は腎不全である請求項1乃至6記載の予防又は治療方法。
8. (1) AOP-1をコードする核酸若しくはAOP-1のアミノ酸配列中のアミノ酸が1つ以上付加、欠失、置換されたAOP-1の機能を有するポリペプチドをコードする核酸、又は(2) AOP-1遺伝子の発現を増強する物質、AOP-1の産生を増強する物質若しくはAOP-1の機能を増強する物質、を有効成分として

含有する AOP-1 遺伝子又は AOP-1 の発現減少を伴う疾患の予防薬又は治療薬。

9. AOP-1 をコードする核酸又は AOP-1 のアミノ酸配列中のアミノ酸が 1 つ以上付加、欠失、置換された AOP-1 の機能を有するポリペプチドをコードする核酸を有効成分として含有する請求項 8 記載の予防薬又は治療薬。

- 5 10. AOP-1 遺伝子の発現を増強する物質を有効成分として含有する請求項 8 記載の予防薬又は治療薬。

11. AOP-1 の産生を増強する物質を有効成分として含有する請求項 8 記載の予防薬又は治療薬。

- 10 12. AOP-1 の産生を増強する作用を有する物質が、AOP-1 をコードする核酸又は AOP-1 のアミノ酸配列中のアミノ酸が 1 つ以上付加、欠失、置換された AOP-1 の機能を有するポリペプチドをコードする核酸である請求項 11 記載の予防薬又は治療薬。

13. AOP-1 の機能を増強する物質を有効成分として含有する請求項 8 記載の予防薬又は治療薬。

- 15 14. AOP-1 遺伝子又は AOP-1 の発現減少を伴う疾患が、慢性心不全、虚血性心不全、虚血性心疾患、慢性関節リウマチ、神経変性疾患、肝疾患又は腎不全である請求項 8 乃至 13 記載の予防薬又は治療薬。

- 15 15. AOP-1 遺伝子の発現量又は AOP-1 の産生量を測定し、当該発現量又は産生量を指標として診断することからなる AOP-1 遺伝子又は AOP-1 の発現減少を伴う疾患の診断方法。

16. AOP-1 遺伝子又は AOP-1 の発現減少を伴う疾患が、慢性心不全、虚血性心不全、虚血性心疾患、慢性関節リウマチ、神経変性疾患、肝疾患又は腎不全である請求項 15 記載の診断方法。

- 25 17. AOP-1 遺伝子の発現量又は AOP-1 の産生量を指標として測定する手段を含む AOP-1 遺伝子又は AOP-1 の発現減少を伴う疾患の診断剤又は診断キット。

18. AOP-1 遺伝子又は AOP-1 の発現減少を伴う疾患が、慢性心不全、虚血性心不全、虚血性心疾患、慢性関節リウマチ、神経変性疾患、肝疾患又は腎不全である請求項 17 記載の診断剤又は診断キット。

19. AOP-1 の産生を抑制、AOP-1 遺伝子の発現を抑制又は AOP-1 遺伝子を

欠失することにより AOP-1 遺伝子又は AOP-1 の発現減少を伴う疾患の疾患モデルとして使用できる非ヒト形質転換動物。

20. AOP-1 遺伝子又は AOP-1 の発現減少を伴う疾患が、慢性心不全、虚血性心不全、虚血性心疾患、慢性関節リウマチ、神経変性疾患、肝疾患又は腎不全

5 である請求項 19 記載の非ヒト形質転換動物。

21. AOP-1 の産生を抑制、AOP-1 遺伝子を発現抑制又は AOP-1 遺伝子を欠失することにより AOP-1 遺伝子又は AOP-1 の発現減少を伴う疾患の組織モデル又は細胞モデルとして使用できる形質転換組織又は形質転換細胞。

22. AOP-1 遺伝子又は AOP-1 の発現減少を伴う疾患が、慢性心不全、虚血性心不全、虚血性心疾患、慢性関節リウマチ、神経変性疾患、肝疾患又は腎不全
10 である請求項 20 記載の形質転換組織又は形質転換細胞。

23. 請求項 18 乃至 21 記載の非ヒト形質転換動物、形質転換組織又は形質転換細胞に、合成若しくは遺伝子組換え技術により得られた物質、天然由来の物質又はそれらの誘導体である物質を投与又は添加し、AOP-1 遺伝子の発現量または AOP-1 の産生量を検出することを含む、AOP-1 遺伝子の発現を増強する物質、AOP-1 の産生を増強する物質及び AOP-1 の機能を増強する物質からなる群から
15 選ばれる少なくとも 1 つをスクリーニングする方法。

24. 合成若しくは遺伝子組換え技術により得られた物質、天然由来の物質又はそれらの誘導体である物質を、(1) AOP-1 遺伝子の転写制御領域及び AOP-1
20 遺伝子若しくはレポーター遺伝子を有する形質転換細胞又は試験管内発現系と接触させ、AOP-1 遺伝子又はレポーター遺伝子の発現量を検出すること、又は(2) AOP-1 又は AOP-1 の標的分子と接触させ、AOP-1 又は AOP-1 の標的分子の量を検出すること、を含む AOP-1 遺伝子の発現を増強する物質、AOP-1 の産生を増強する物質及び AOP-1 の機能を増強する物質からなる群から選ばれる少なくとも 1 つをスクリーニングする方法。
25

25. AOP-1 遺伝子の転写制御領域をレポーター遺伝子の翻訳領域の上流又は下流に連結した発現ベクターを構築後、適当な宿主細胞に導入して培養し、当該培養細胞に合成若しくは遺伝子組換え技術により得られた物質、天然由来の物質又はそれらの誘導体である物質を添加し、一定時間後にレポーター遺伝子の発現

量又はレポータータンパク質の産生量の変化を検出することを含む請求項 2 4 記載のスクリーニング方法。

26. 合成若しくは遺伝子組換え技術により得られた物質、天然由来の物質又はそれらの誘導体である物質を AOP-1 又は AOP-1 の標的分子と接触させ、当該物質と結合した又は結合しなかった AOP-1 又は AOP-1 の標的分子の量を検出することを
5 含む請求項 2 4 記載のスクリーニング方法。

27. AOP-1 又は AOP-1 の標的分子を支持体に固定化し、当該固定化した AOP-1 又は AOP-1 の標的分子に、合成若しくは遺伝子組換え技術により得られた物質、天然由来の物質又はそれらの誘導体である物質と AOP-1 又は AOP-1 の
10 標的分子を添加し、結合した又は結合しなかった AOP-1 又は AOP-1 の標的分子の量を検出することを含む請求項 2 4 記載のスクリーニング方法。

28. 合成若しくは遺伝子組換え技術により得られた物質、天然由来の物質又はそれらの誘導体である物質を支持体に固定化し、当該固定化した物質に AOP-1 又は AOP-1 の標的分子を添加し、結合した又は結合しなかった AOP-1 又は
15 AOP-1 の標的分子の量を検出することを含む請求項 2 4 記載のスクリーニング方法。

29. 合成若しくは遺伝子組換え技術により得られた物質、天然由来の物質又はそれらの誘導体である物質を、AOP-1 又は AOP-1 の標的分子と接触させ、AOP-1 の抗酸化又は過酸化亜硝酸消去機能を測定することを含む AOP-1 の機能を
20 を増強する物質のスクリーニング方法。

30. AOP-1 又は AOP-1 の標的分子に、合成若しくは遺伝子組換え技術により得られた物質、天然由来の物質又はそれらの誘導体である物質と AOP-1 又は AOP-1 の標的分子を添加し、AOP-1 の抗酸化又は過酸化亜硝酸消去能を測定することを
含む請求項 2 9 記載のスクリーニング方法。

- 25 31. AOP-1 又は AOP-1 の標的分子を支持体に固定化し、当該固定化した AOP-1 又は AOP-1 の標的分子に、合成若しくは遺伝子組換え技術により得られた物質、天然由来の物質又はそれらの誘導体である物質と AOP-1 又は AOP-1 の標的分子を添加し、AOP-1 の抗酸化又は過酸化亜硝酸消去機能を測定することを含む請求項 2 9 記載のスクリーニング方法。

32. 合成若しくは遺伝子組換え技術により得られた物質、天然由来の物質又はそれらの誘導体である物質を支持体に固定化し、当該固定化した物質に AOP-1 又は AOP-1 の標的分子を添加し、AOP-1 の抗酸化又は過酸化亜硝酸消去機能を測定することを含む請求項 29 記載のスクリーニング方法。

図 1

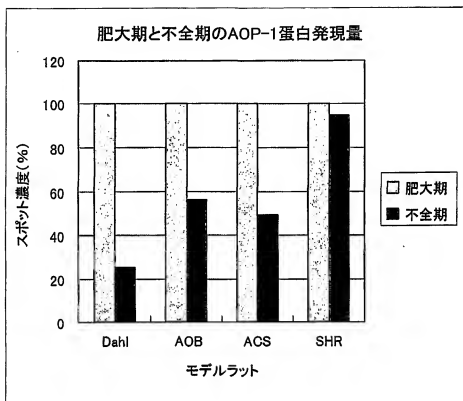


図 2

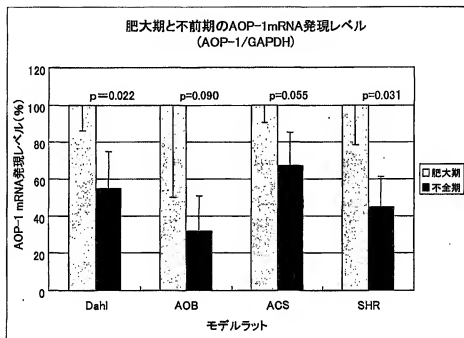


図 3

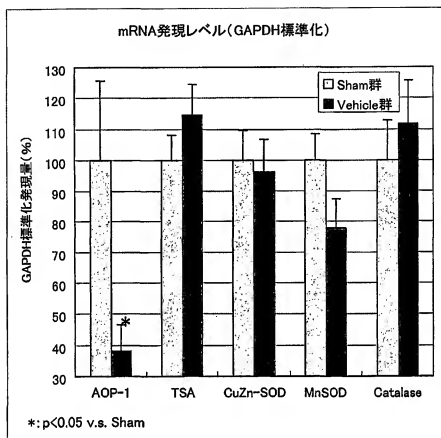


図 4

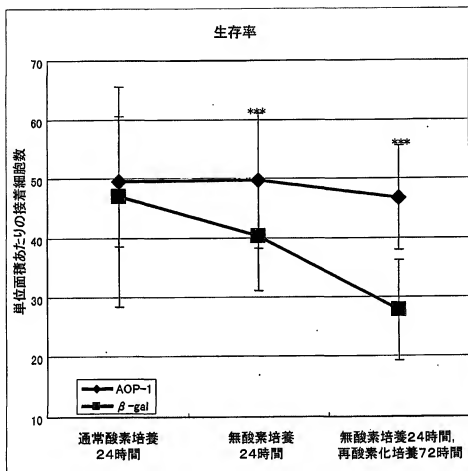


圖 5

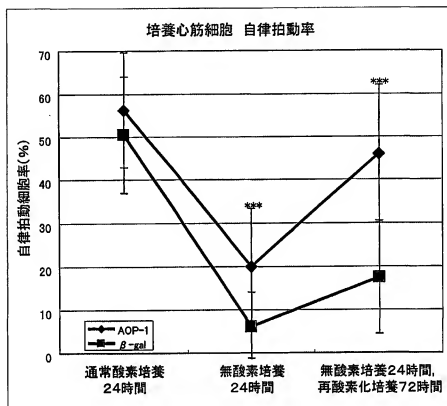


図 6

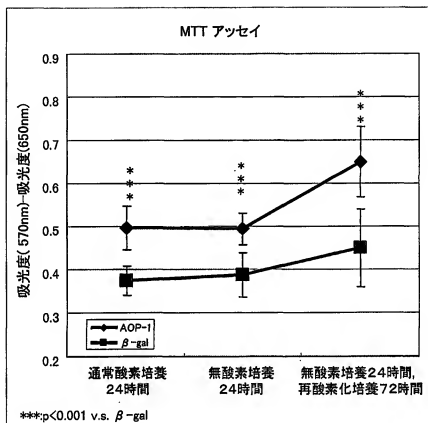


図 7

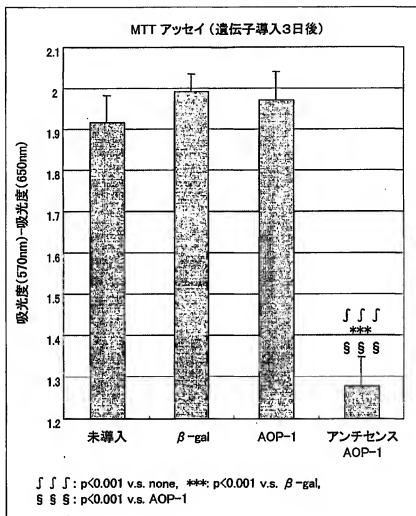


図 8 a

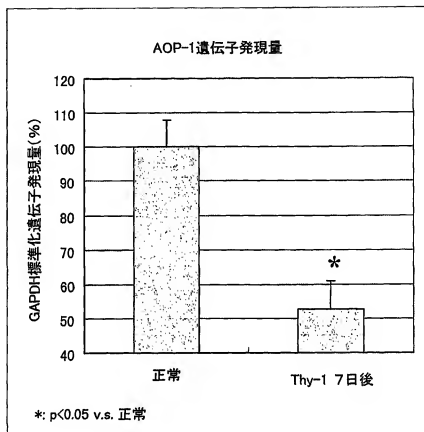


図 8 b

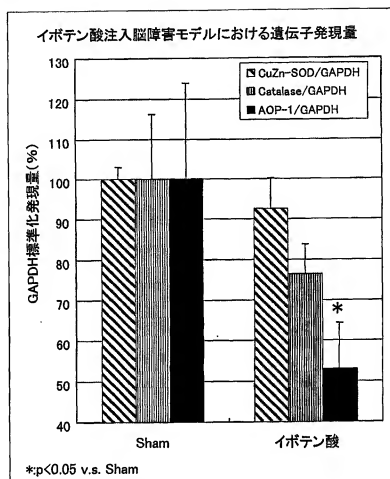


図 9

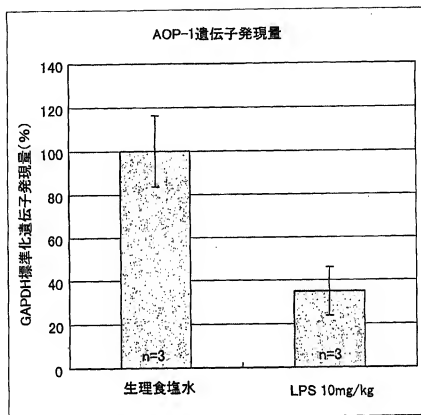


図 10

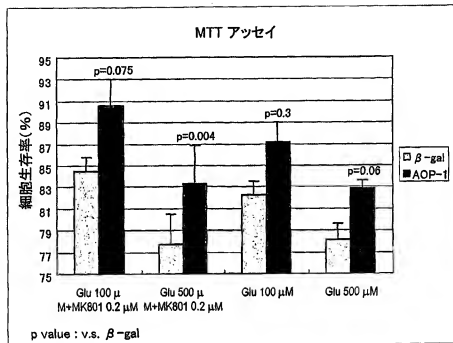


図 1 1

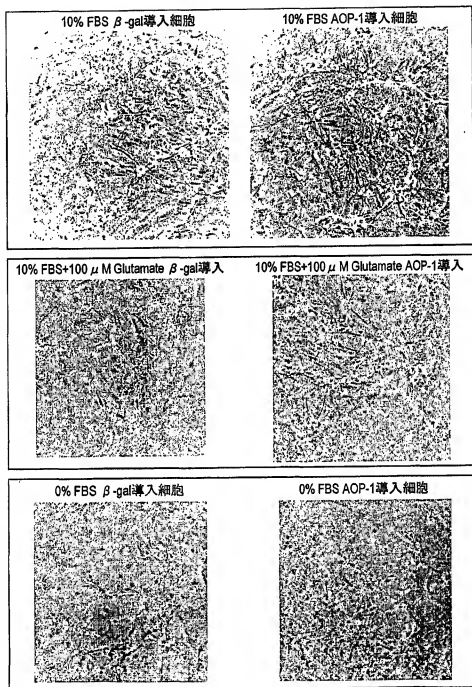


図12a

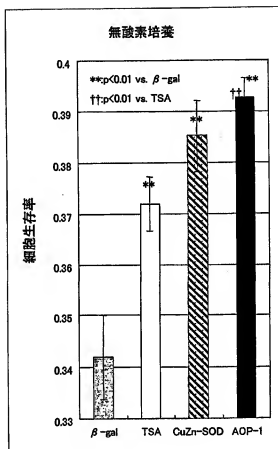


図 1 2 b

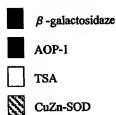
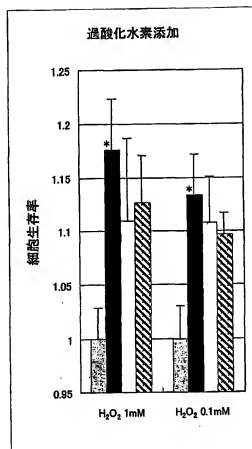


図 1 2 C

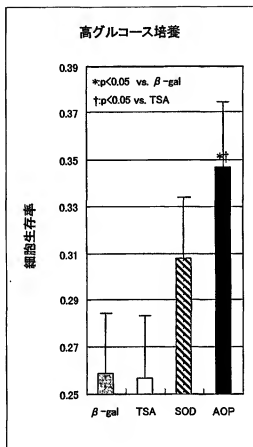


図 13a

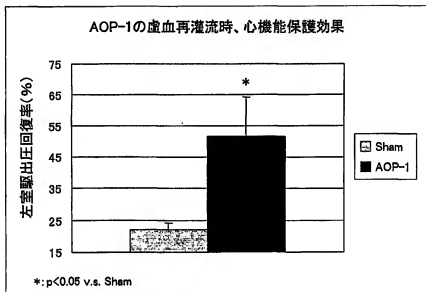


図 13 b

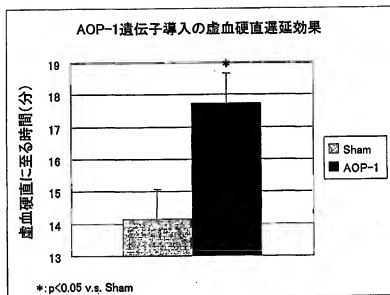


図 13 C

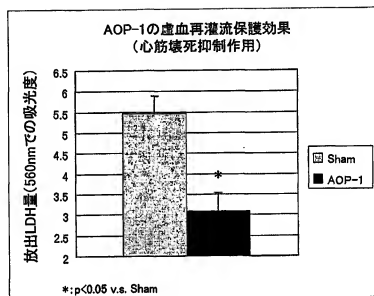


図 1.4 a

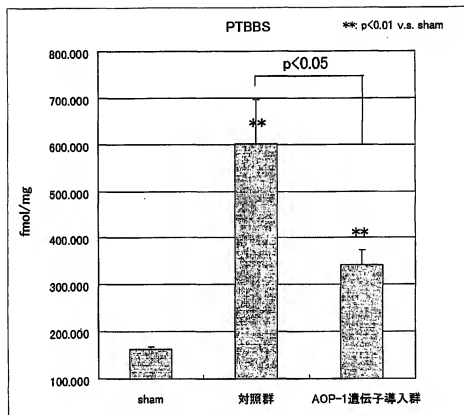


図 1 4 b

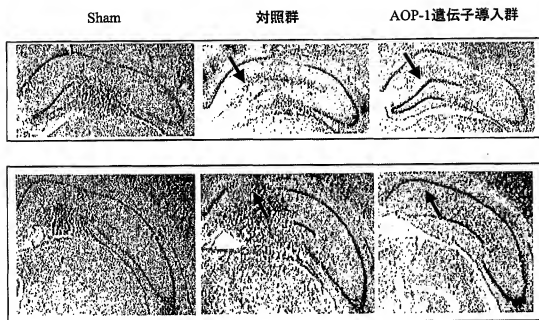


図 15a

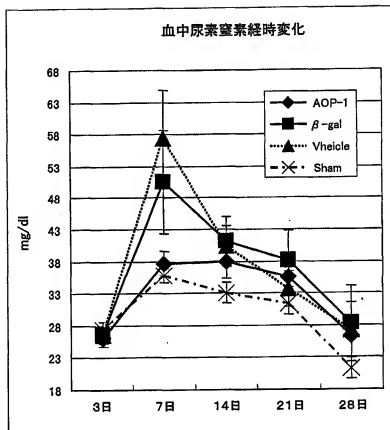


図 15 b

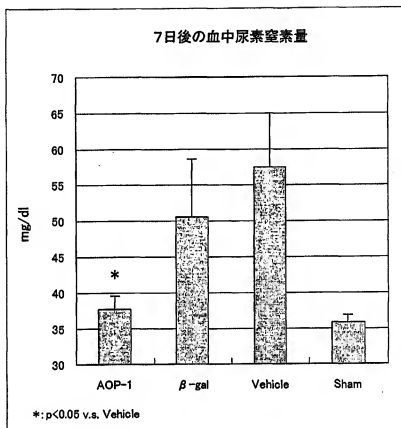
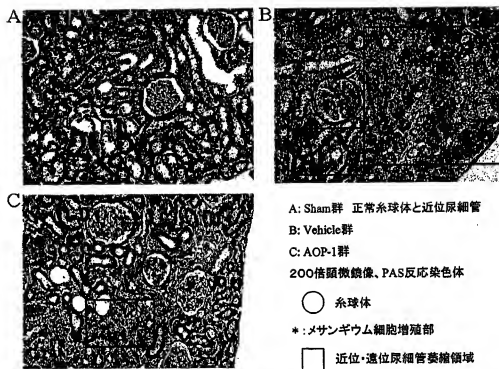


図 15 C



拡大図1(系球体)

A-1: Sham

B-1: Vehicle

C-1: AOP-1



拡大図2(尿管)

正常尿管(AOP-1より)

萎縮尿管(Vehicleより)



【配列表】

<110> サントリー株式会社

株式会社サントリー生物医学研究所

<120> AOP-1 遺伝子又はAOP-1の発現減少を伴う疾患の治療方法及び当該疾患

5 治療薬

<130> YCT-687

<160> 30

<210> 1

10 <211> 1542

<212> mRNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

c t g a a g a i g g   c g g c t g c t g   a g g a c g g t i g   c t c c g a g c g t   c g g t i g c c c g   a c a t g i g a g t   60
15 g c c a t t c c t t   g g g c a t t t c   t g c c a c t g c a   g c c c t c a g g c   c t g c t g c a t g   t g g a a g a a c g   120
a g c t i g a c a a   a t t a t i g t g   t t c t g g t t c c   a g t c a a g c a a   a a t t a t t c a g   c a c c a g t t c c   180
t c a t g c c a t g   c a c c t g c t g t   c a c c c a g c a t   g c a c c c t a t t   t t a a g g t a c   a g c c g t i g t c   240
a a t g g a g a g t   t c a a a g a c c t   a a g c c t t g a t   g a c t t t a a g g   g g a a a t a t t t   g g t g c t t t t c   300
t t c t a t c c t t   t g g a t t t c a c   c t t t g t g t g t   c c t a c a g a a a   t t g t t g c t t t   t a g i g a c a a a   360
20 g c t a a c g a a t   t t c a c g a t g t   g a a c t g t g a a   g t t g t c g c a g   t c t c a g t g g a   t t c c c a c t t t   420
a g c c a t c t i g   c c t g g a t a a a   t a c a c c a a g a   a a g a a t g g t g   g t t t g g g c c a   c a t g a a c a t c   480
g c a c t c t g t g   c a g a c t t a a c   t a a g c a g a t t   t c c c g a g a c t   a c g g t g t g c t   g t t a g a a g g t   540
t c t g g t c t t g   c a c t a a g a g g   t c t c t t c a t a   a t t g a c c c c a   a t g g a g t c a t   c a a g c a t t t g   600
a g c t g c a a c g   a t c t c c c a g t   g g g c c g a a g c   g t g g a a g a a a   c c c t c c g c t t   g g t g a a g g c g   660
25 t t c c a g t a t g   t a g a a a c a c a   t g g a g a a g t c   t g c c a g c g a   a c t g g a c a c c   g g a t t c t c c t   720
a c g a t c a a c g   c a a g t c c a g c   t g c t t c c a a a   g a g t a c t t t c   a g a a g g t a a a   t c a g t a g a t c   780
a c c c a t g t g t   a t c t g c a c c t   t c t c a a c t g a   g a g a a g a a c c   a c a g t g a a a   c c t g c t t t t a   840
t c a t t t t c a a   g a t g g t t a t t   t g t a g a a g g c   a a g g a a c c a a   t t a t g c t t g t   a t t c a t a a g t   900
a t t a c t c t a a   a t g t t t t g t t   t t t g t a a t t c   t g g c t a g g a c   c t t t t a a c a   t g g t t a g t t g   960

```

ctagtacagg aatcgittat tggtaacatc ttggiggctg gctagctagt tictacagaa 1020
 cataattgc cictatagaa ggctattctt agatcatgic tcaatggaaa cactcttctt 1080
 icttagccti acttgaatct tgcctataat aaagtagagc aacacacatt gaaagcttct 1140
 gatcaacggt cctgaaattt tcatcttgaa tgcctttgta ttaacttgaa ttttcttita 1200
 5 agctaacaaa gatcataatt ttcaatgatt agccgtgtaa ctctcgcaat gaagtittat 1260
 gtgattgaag caaatgtgaa tcgtattatt ttaaaaagtg gcagagtgac ttaactgac 1320
 atgcatgac cctcatccct gaaattgagt ttaatgagc atttactta ttttaticat 1380
 tagctiaacti tgtctatgta tatttctaga tattgattag tgtaalcgat tataaggat 1440
 attatcaaa tccagggtat gcatittgaa attataaita ttttcttgc tgaagtattc 1500
 10 atgtiaaac atacaataa cataatttaa caaaaaaaaa aa 1542

<210> 2

<211> 1433

<212> mRNA

15 <213> Rattus norvegicus

<400> 2

gctatcgigg cicttgcgtt ctctgaagat ggccgcagct gcgggaaggt tgcctcggic 60
 ctccggggct cggccctgca gcactatttt ccggagtatt tctgcctcaa cagticttag 120
 gcccttgctt tctagaagaa ccgtcttgac agacatgctg tggctcgcct glccccaagc 180
 20 aaagtittgc ttagcacca gtcttctatt ccacacccct gcctgacccc agcatcgccc 240
 ccatitttaa ggtactcgtg ttgtcaatgg agagttaaaa gagctgagtc tgcagcattt 300
 taaggggaaa tacttggctg ttttcttcta ccttttggat ttacatttg tgtgtcctac 360
 agaaattgtt gctttcagtg acaaagccaa tgagtttcat gacgtaaact gtaagtagt 420
 tgcggttctt gtggtatccc acttcagtca tcttgccctg atcaacacgc caagaaagaa 480
 25 tgggtggttg ggccacatga acatcacgct gtgtcggag ttaactaagc agatatcccg 540
 agactacgga gtactgttgg aaagtcctgg catlccgctc agaggctctt tcatattaga 600
 ccctaatggt gtatcaagc acctgaggtt caatgacctt ccggctggcc gaagtgtgga 660
 agaacccttc cgtttggtta aggcgttcca gtttgtggag acccatggag aagctgcgcc 720
 acccaactgg acaccagagt cccctacgat caagccaagt ccaacagctt caaaagagta 780

ctitgagaag giccatcaat aataggicat cctatgtctg ctgggttacc tgaagcttct 840
 catgccaaaa gagagcccca gctgggaatcc igaagattat ttatagaatg gcaaaaacct 900
 caccalgcit gigtittataa gtactgcicc atgggccttg taattttaag acagggttcag 960
 gttaaaggig gccagctcct tccatagctg tcccttactag ggactctctg atggctacca 1020
 5 attctctaca agtgcttggg cccatttct tagatcatgt ctccagaggg ttaagatttc 1080
 ttacgtgcc ctgaagcttg gtctacagtg aagiagcaca tagcaccagt acttagtgaa 1140
 atgaagtacg acatagcgcc agcacttagt gaaatgaagt agcatatagt gccagcactt 1200
 agtgaagctt tctgatcaag gtccigaaat ttctcttgg atttttgta attatgctga 1260
 atttccattt attttttagt gtatgcttta actcacagtg tcttctgttg ttctaaggta 1320
 10 ttgatgagtt ataatcatga aggactatgt ttctaaaaca ctatgctatt ttcttttctt 1380
 caagtgctgg atgtaaagaa taaaaataaa cattaagata aaaaaaaaaa aaa 1433

<210> 3

<211> 1382

15 <212> mRNA

<213> mouse

<400> 3

ctactcctcg gtaicccgc ctatcgtgcc tcttgcgtgc tctgaagatg gcggcagctg 60
 cgggaagggt gctciggctc tgggttgcgc gtcattgaag tgctatttcc cggagtattt 120
 20 ctgccctaac agttcttagg cctgttgcct ctagaagaac ctgttgaca gacatactgt 180
 ggtcttgcct tgcceaaagg aagtcagcct tttagcaccag ttctcttctt cacaccttg 240
 ctgtcaccca gcacgcgcc tattttaaag gtactgcgtg tgtcaatgga gagttcaaa 300
 agctgagctt cgacgacttt aagggaataa acttgggtgt ttcttctctt ccttggatt 360
 tccatttctt ggtctctaca gaaattgttg ctttcagtga caaagccaat gaatttcatg 420
 25 atgtaaactg igaagtagtt gcagtttcag tggattccca cttcagtcatt ctgtccctga 480
 tcaacacacc aagaaagaat gggtgtttgg gccacatgaa catcacactg ttgtcgga 540
 taactaaagca gataccccga gactacggag tgcgttgga aagtgctggc atgacacta 600
 gaggctcctt cattattgac cctaaagggt tctcaagca cctgagtgct aacgaccttc 660
 cgttggggcg cagtgtgga gaaacactcc gtttggtaaa ggctgttcag ttgttagaga 720

cccatggaga agtctgcccc gccaaactgga caccagagtc cccacgatac aagccaagtc 780
 caacagcttc caaagagtac ttgagaagg tccatcagta ggccalecta tgtctgcaai 840
 taccigaagc ttticaggcc aaaaaagagc cccagctgga atccctccaa tgccttgag 900
 attattata gaatggcaaa accicattat gtitgtitit ataagctatg ctccacaggc 960
 5 tttgaattc taagacaggt tcaggctctc taaagtggc tagctgcttc catagctgcc 1020
 ctactaggc actcttgggt ggctaacc aa tctccccga gtccttgcc cccattctt 1080
 ggaicatgtc cttagagggt aagcattctt tcccttagcc tgccttgac cttggtctac 1140
 agtgaagtag cacatagtc cagtacttgg tgaatgaag tagcacatag caccagcact 1200
 taatggaagc tctgatcaa ggtcctaaaa tttctcttg aatttttg tgaattatgc 1260
 10 aatttccctt tttttttt taaacaggtt ccttgttgt tctagggtat tgaagagga 1320
 taatcatgaa ggactatgtc taatccataa gtcatttct tcaagagctg gatatataga 1380
 at 1382

<210> 4

15 <211> 256

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Ala Ala Ala Val Gly Arg Leu Leu Arg Ala Ser Val Ala Arg His
 20 5 10 15
 Val Ser Ala Ile Pro Trp Gly Ile Ser Ala Thr Ala Ala Leu Arg Pro
 20 25 30
 Ala Ala Cys Gly Arg Thr Ser Leu Thr Asn Leu Leu Cys Ser Gly Ser
 35 40 45
 25 Ser Gln Ala Lys Leu Phe Ser Thr Ser Ser Ser Cys His Ala Pro Ala
 50 55 60
 Val Thr Gln His Ala Pro Tyr Phe Lys Gly Thr Ala Val Val Asn Gly
 65 70 75 80
 Glu Phe Lys Asp Leu Ser Leu Asp Asp Phe Lys Gly Lys Tyr Leu Val

		85		90		95										
	Leu	Phe	Phe	Tyr	Pro	Leu	Asp	Phe	Thr	Phe	Val	Cys	Pro	Thr	Glu	Ile
				100						105					110	
	Val	Ala	Phe	Ser	Asp	Lys	Ala	Asn	Glu	Phe	His	Asp	Val	Asn	Cys	Glu
5			115					120						125		
	Val	Val	Ala	Val	Ser	Val	Asp	Ser	His	Phe	Ser	His	Leu	Ala	Trp	Ile
			130					135					140			
	Asn	Thr	Pro	Arg	Lys	Asn	Gly	Gly	Leu	Gly	His	Met	Asn	Ile	Ala	Leu
	145				150					155				160		
10	Leu	Ser	Asp	Leu	Thr	Lys	Gln	Ile	Ser	Arg	Asp	Tyr	Gly	Val	Leu	Leu
				165						170				175		
	Glu	Gly	Ser	Gly	Leu	Ala	Leu	Arg	Gly	Leu	Phe	Ile	Ile	Asp	Pro	Asn
				180						185				190		
	Gly	Val	Ile	Lys	His	Leu	Ser	Val	Asn	Asp	Leu	Pro	Val	Gly	Arg	Ser
15		195						200					205			
	Val	Glu	Glu	Thr	Leu	Arg	Leu	Val	Lys	Ala	Phe	Gln	Tyr	Val	Glu	Thr
		210						215					220			
	His	Gly	Glu	Val	Cys	Pro	Ala	Asn	Trp	Thr	Pro	Asp	Ser	Pro	Thr	Ile
	225				230					235				240		
20	Lys	Pro	Ser	Pro	Ala	Ala	Ser	Lys	Glu	Tyr	Phe	Gln	Lys	Val	Asn	Gln
				245						250				255		

<210> 5

<211> 257

25 <212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 5

Met Ala Ala Ala Ala Gly Arg Leu Leu Trp Ser Ser Val Ala Arg Pro

5

10

15

Ala Ser Thr Ile Phe Arg Ser Ile Ser Ala Ser Thr Val Leu Arg Pro
 20 25 30
 Val Ala Ser Arg Arg Thr Cys Leu Thr Asp Met Leu Trp Ser Ala Cys
 35 40 45
 5 Pro Gln Ala Lys Phe Ala Phe Ser Thr Ser Ser Ser Phe His Thr Pro
 50 55 60
 Ala Val Thr Gln His Ala Pro His Phe Lys Gly Thr Ala Val Val Asn
 65 70 75 80
 Gly Glu Phe Lys Glu Leu Ser Leu Asp Asp Phe Lys Gly Lys Tyr Leu
 10 85 90 95
 Val Leu Phe Phe Tyr Pro Leu Asp Phe Thr Phe Val Cys Pro Thr Glu
 100 105 110
 Ile Val Ala Phe Ser Asp Lys Ala Asn Glu Phe His Asp Val Asn Cys
 115 120 125
 15 Glu Val Val Ala Val Ser Val Asp Ser His Phe Ser His Leu Ala Trp
 130 135 140
 Ile Asn Thr Pro Arg Lys Asn Gly Gly Leu Gly His Met Asn Ile Thr
 145 150 155 160
 Leu Leu Ser Asp Leu Thr Lys Gln Ile Ser Arg Asp Tyr Gly Val Leu
 20 165 170 175
 Leu Glu Ser Ala Gly Ile Ala Leu Arg Gly Leu Phe Ile Ile Asp Pro
 180 185 190
 Asn Gly Val Ile Lys His Leu Ser Val Asn Asp Leu Pro Val Gly Arg
 195 200 205
 25 Ser Val Glu Glu Pro Leu Arg Leu Val Lys Ala Phe Gln Phe Val Glu
 210 215 220
 Thr His Gly Glu Val Cys Pro Pro Asn Trp Thr Pro Glu Ser Pro Thr
 225 230 235 240
 Ile Lys Pro Ser Pro Thr Ala Ser Lys Glu Tyr Phe Glu Lys Val His

	245	250	255
Gln			
<210> 6			
5 <211> 257			
<212> PRT			
<213> mouse			
<400> 6			
Met Ala Ala Ala Gly Arg Leu Leu Trp Ser Ser Val Ala Arg His			
10	5	10	15
Ala Ser Ala Ile Ser Arg Ser Ile Ser Ala Ser Thr Val Leu Arg Pro			
	20	25	30
Val Ala Ser Arg Arg Thr Cys Leu Thr Asp Ile Leu Trp Ser Ala Ser			
	35	40	45
15 Ala Gln Gly Lys Ser Ala Phe Ser Thr Ser Ser Ser Phe His Thr Pro			
	50	55	60
Ala Val Thr Gln His Ala Pro Tyr Phe Lys Gly Thr Ala Val Val Asn			
	65	70	75
Gly Glu Phe Lys Glu Ser Leu Asp Asp Phe Lys Gly Lys Tyr Leu			
20	85	90	95
Val Leu Phe Phe Tyr Pro Leu Asp Phe Thr Phe Val Cys Pro Thr Glu			
	100	105	110
Ile Val Ala Phe Ser Asp Lys Ala Asn Glu Phe His Asp Val Asn Cys			
	115	120	125
25 Glu Val Val Ala Val Ser Val Asp Ser His Phe Ser His Leu Ala Trp			
	130	135	140
Ile Asn Thr Pro Arg Lys Asn Gly Gly Leu Gly His Met Asn Ile Thr			
	145	150	155
Leu Leu Ser Asp Ile Thr Lys Gln Ile Ser Arg Asp Tyr Gly Val Leu			

	165	170	175
	Leu Glu Ser Ala Gly Ile Ala Leu Arg Gly Leu Phe Ile Ile Asp Pro		
	180	185	190
	Asn Gly Val Val Lys His Leu Ser Val Asn Asp Leu Pro Val Gly Arg		
5	195	200	205
	Ser Val Glu Glu Thr Leu Arg Leu Val Lys Ala Phe Gln Phe Val Glu		
	210	215	220
	Thr His Gly Glu Val Cys Pro Ala Asn Trp Thr Pro Glu Ser Pro Thr		
	225	230	235
10	Ile Lys Pro Ser Pro Thr Ala Ser Lys Glu Tyr Phe Glu Lys Val His		
	245	250	255

Gln

<210> 7
 15 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 7
 igcagittica gggattccc a
 20
 <210> 8
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 25 <400> 8
 ttcatgtggc ccaaacca

<210> 9
 <211> 28

<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 9
tcttgccctgg atcaacacac caagaaag
5
<210> 10
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
10 <400> 10
ccctctgctt gctgatgiga ct

<210> 11
<211> 20
15 <212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 11
ccigtaagcg atgccctcat

20 <210> 12
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 12
25 agcttgtccc agaattacgg cgtgttgaa

<210> 13
<211> 19
<212> DNA

<213> Artificial Sequence
<400> 13
gcggatgaag agaggcatg

5 <210> 14
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 14
10 gccacacggt cctttcca

<210> 15
<211> 23
<212> DNA
15 <213> Artificial Sequence
<400> 15
. lggagacctg ggcaatgtgg ctg

<210> 16
20 <211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 16
acgggigtct agctctc

25 <210> 17
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<400> 17
aggcttgigc ccigcttc

<210> 18
5 <211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 18
cagcctgcac tgaaggagatc cctca

10
<210> 19
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
15 <400> 19
aaccgcggtc gtggetcttg cgttctct

<210> 20
<211> 30
20 <212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 20
gcgctagctt attgatggac ctctc aaag

25 <210> 21
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 21

ttacagattg ccgcctgctc

<210> 22

<211> 20

5 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 22

ccagcagttg aataaggcct

10 <210> 23

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 23

15 aatcacgacc cactgcaagg aacca

<210> 24

<211> 19

<212> DNA

20 <213> Artificial Sequence

<400> 24

tgcaccacca actgcttag

<210> 25

25 <211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 25

ggatgcaggg atgatgttc

<210> 26
 <211> 23
 <212> DNA
 5 <213> Artificial Sequence
 <400> 26
 cagaagactg tggatggccc ctc

 <210> 27
 10 <211> 877
 <212> mRNA
 <213> Rattus norvegicus
 <400> 27
 gaattcggca cgagggtcgt cgcgtgtcc ggctcttggc cagcgagica tggcctccgg 60
 15 caacgcgcac atcggaagc ctgcccciga ctacacgggc accgccgtgg tggatgtgtc 120
 cttaaggaa atcaagcttt cagactacag aggaagiac gtgtctctct tttctatcc 180
 atggacttc actttgttt gccccacga galcatcgt ttagcgacc acgtgagga 240
 ctccgaaag ctaggctcgc aggtgtggg agtgtgtgt gactctcagt taccacact 300
 ggccigtatc aataccacc ggaaggagg aggttgggc ccactgaata tccctctgt 360
 20 tctgtatgt actaaaagt tgtccagaa ttacggcgig ttgaaaaat atgaggcat 420
 cgtttacagg ggctcttta tcatcgtgc caagggtgt cttgccaga tcacagtcaa 480
 cgacctacct gtgggacgt ctgtataga ggtctccgc ctgtccagg ctttcagta 540
 tacagatgag catggggaag tctgtctgc tggctggaag cccggcagt acacatcaa 600
 acccaatgt gatgacaga aggaatacti ctccaacac aactgagat ggtaaatac 660
 25 ggtgagccig aatccggat ctaccctgc ccttacctg gatgtcctg ctgtggccag 720
 aaaacgttag atcttctct acattctaaa ggggtggag gctaggcca ggctttctca 780
 tiaccacctt ggaatcgtt gaatagtag cctgccctga gcacaccag ctgggccag 840
 gtctatagga aaccaataaa gtattagga cagtga 877

<210> 28

<211> 198

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

5 <400> 28

	Met	Ala	Ser	Gly	Asn	Ala	His	Ile	Gly	Lys	Pro	Ala	Pro	Asp	Phe	Thr
					5					10					15	
	Gly	Thr	Ala	Val	Val	Asp	Gly	Ala	Phe	Lys	Glu	Ile	Lys	Leu	Ser	Asp
					20					25					30	
10	Tyr	Arg	Gly	Lys	Tyr	Val	Val	Leu	Phe	Phe	Tyr	Pro	Leu	Asp	Phe	Thr
					35					40					45	
	Phe	Val	Cys	Pro	Thr	Glu	Ile	Ile	Ala	Phe	Ser	Asp	His	Ala	Glu	Asp
					50					55					60	
	Phe	Arg	Lys	Leu	Gly	Cys	Glu	Val	Leu	Gly	Val	Ser	Val	Asp	Ser	Gln
15	65					70						75				80
	Phe	Thr	His	Leu	Ala	Trp	Ile	Asn	Thr	Pro	Arg	Lys	Glu	Gly	Gly	Leu
						85						90				95
	Gly	Pro	Leu	Asn	Ile	Pro	Leu	Leu	Ala	Asp	Val	Thr	Lys	Ser	Leu	Ser
						100						105				110
20	Gln	Asn	Tyr	Gly	Val	Leu	Lys	Asn	Asp	Glu	Gly	Ile	Ala	Tyr	Arg	Gly
						115									120	
	Leu	Phe	Ile	Ile	Asp	Ala	Lys	Gly	Val	Leu	Arg	Gln	Ile	Thr	Val	Asn
						130									135	
	Asp	Leu	Pro	Val	Gly	Arg	Ser	Val	Asp	Glu	Ala	Leu	Arg	Leu	Val	Gln
25	145						150					155				160
	Ala	Phe	Gln	Tyr	Thr	Asp	Glu	His	Gly	Glu	Val	Cys	Pro	Ala	Gly	Trp
						165						170				175
	Lys	Pro	Gly	Ser	Asp	Thr	Ile	Lys	Pro	Asn	Val	Asp	Asp	Ser	Lys	Glu
						180						185				190

Tyr Phe Ser Lys His Asn

195

<210> 29

5 <211> 560

<212> mRNA

<213> Homo sapiens

<400> 29

```

atggcgacga aggccgtgtg cgtgctgaag ggcgacggcc cagtgcaggg catcatcaat   60
10 ttccagcaga aggaaagtaa tggaccagtg aagggtgggg gaagcattaa aggactgact  120
gaagggctgc atggattcca igttcaltgag ttggagata atacggcagg ctglaccagt  180
gcaggctctc actttaatcc tctatccaga aaacacggtg ggccaaagga tgaagagagg  240
catgttggag acttgggcaa tgtgactgct gacaaagatg gtgtggccga tgtgtctatt  300
gaagattctg tgaatcact ctcaggagac catlgtatca ttggccgcac actgggggtc  360
15 catgaaaaag cagatgactt ggccaaaggt ggaaatgaag aaagtacaaa gacaggaaac  420
gctggaagtc gtttggcttg tgggttaatt gggatcgccc aataaacatt ccttggatg  480
tagtctgagg ccccttaaci catcgttat ccgctagct gtagaaatgt atcctgataa  540
acattaaaca ctgtaacttt                                     560

```

20 <210> 30

<211> 154

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

25 Met Ala Thr Lys Ala Val Cys Val Leu Lys Gly Asp Gly Pro Val Gln

5

10

15

Gly Ile Ile Asn Phe Glu Gln Lys Glu Ser Asn Gly Pro Val Lys Val

20

25

30

Trp Gly Ser Ile Lys Gly Leu Thr Glu Gly Leu His Gly Phe His Val

	35		40		45											
	His	Glu	Phe	Gly	Asp	Asn	Thr	Ala	Gly	Cys	Thr	Ser	Ala	Gly	Pro	His
	50					55						60				
	Phe	Asn	Pro	Leu	Ser	Arg	Lys	His	Gly	Gly	Pro	Lys	Asp	Glu	Glu	Arg
5	65					70					75				80	
	His	Val	Gly	Asp	Leu	Gly	Asn	Val	Thr	Ala	Asp	Lys	Asp	Gly	Val	Ala
					85						90				95	
	Asp	Val	Ser	Ile	Glu	Asp	Ser	Val	Ile	Ser	Leu	Ser	Gly	Asp	His	Cys
					100					105				110		
10	Ile	Ile	Gly	Arg	Thr	Leu	Val	Val	His	Glu	Lys	Ala	Asp	Asp	Leu	Gly
					115					120				125		
	Lys	Gly	Gly	Asn	Glu	Glu	Ser	Thr	Lys	Thr	Gly	Asn	Ala	Gly	Ser	Arg
					130					135				140		
	Leu	Ala	Cys	Gly	Val	Ile	Gly	Ile	Ala	Gln						
15	145					150										